



EFFECTO DE LOS TOCOTRIENOS NATURALES DE LA DIETA SOBRE EL
PERFIL LIPIDICO Y LA CAPACIDAD OXIDATIVA DE LAS LDL EN CONEJOS
NUEVA ZELANDA Y EN ADULTOS HUMANOS

LILIA YADYRA CORTES SANABRIA., ND., MSc

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ, 2012

EFFECTO DE LOS TOCOTRIENOS NATURALES DE LA DIETA SOBRE EL
PERFIL LIPIDICO Y LA CAPACIDAD OXIDATIVA DE LAS LDL EN CONEJOS
NUEVA ZELANDA Y EN ADULTOS HUMANOS

LILIA YADYRA CORTES SANABRIA., ND., MSc

TESIS

Presentado como requisito para optar al título de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR:

CARLOS CORREDOR PEREIRA, Ph.D

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ, 2012

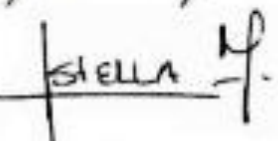
EFFECTO DE LOS TOCOTRIENOS NATURALES DE LA DIETA SOBRE EL
PERFIL LIPIDICO Y LA CAPACIDAD OXIDATIVA DE LAS LDL EN CONEJOS
NUEVA ZELANDA Y EN ADULTOS HUMANOS

LILIA YADYRA CORTES SANABRIA., ND., MSc


APROBADO




Carlos Corredor Pereira, Ph.D
Director



Luz Stella Alvarez, ND., PhD.
Jurado



Diego Gaitan., MD., MSc., PhD.
Jurado



Ana Cristina Palacios., MD.,
Especialista en cardiología
Jurado

Manuel Franco., MD., PhD
Director Posgrado



Maria Victoria Benjumea., ND., PhD
Jurado



Wilson Mejia., Biol., MSc., PhD.
Jurado

Ingrid Schuler., PhD
Decana Académica

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Solo velará por que se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a todos los que creyeron en mí, a toda la gente que me apoyo, a mis familiares, amigos y a esta institución que me ha formado, pero en especial se lo dedico a mi padre fallecido quien lamentablemente no está conmigo para disfrutar este día.

Mis agradecimientos a mi madre que fue pilar fundamental en mi formación y educación como persona, a ella y a mi amado esposo que me apoyo siempre, dispuesto a colaborar no solo como pareja sino como profesional, alentándome para que culminara este proceso; solo puedo decirles GRACIAS desde el fondo de mi corazón, soy la persona más afortunada del mundo por tenerlos a mi lado.

A mi hermano Edgar y sobrinos Lina María, Juan Pablo y José Luis, que con paciencia y amor siempre me recordaron que esta era una meta que debía culminar.

A mi tutor, el Dr. Carlos Corredor, que más que un tutor ha sido un amigo y ejemplo a seguir de lo que debe ser un maestro, estoy segura que sin su apoyo y comprensión nunca hubiera logrado culminar esta etapa de mi vida. Siempre lo llevare en mi corazón y solo le puedo decir que me esforzare al máximo para ser un ejemplo para mis alumnos, tal como el me lo enseñó durante todos estos años. No puedo olvidar agradecer también a mi querida amiga Cristina, quien con gran paciencia me lo prestó por largos ratos.

Finalmente, a mis amigos, los que han pasado y los que se han quedado, porque todos Uds. han marcado mi vida de alguna forma y me han abierto los ojos al mundo.

A todos Uds., solo puedo decirles que mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles. Espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso, sincero e incondicional apoyo.

AGRADECIMIENTOS

- Centro de investigación e innovación tecnológica en palma de aceite – CENIPALMA, por el apoyo prestado suministrando los aceites de palma, soya y girasol puros. Igualmente por facilitarnos sus equipos para la determinación de las concentraciones de vitamina E en ingredientes, dietas y plasma.
- Dra Helena Stachenko - Laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, por su apoyo en la determinación del perfil de ácidos grasos en ingredientes, dietas y plasma.
- NUTRYR, por el apoyo en la planificación y preparación de las dietas semisintéticas para los animales de experimentación.
- Dr. Darío Echeverri de la Fundación Cardio Infantil, por su apoyo en la determinación de la función endotelial y de la formación de placa ateromatosa.
- Carrera de Veterinaria de la Universidad de La Salle, por facilitarnos su Bioterio para el mantenimiento de los animales de experimentación.
- Ingeniera Ligia Rodriguez de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, por su gran apoyo en la estandarización y desarrollo de las pruebas de capacidad oxidativa de la LDL.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página #
1. Alcance y definición del Problema de investigación.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. La vitamina E.....	3
2.1.1. Estructura.....	3
2.1.2. Absorción, transporte, captación celular y metabolismo.....	5
2.1.3. Funciones.....	12
2.1.4. Alimentos fuente.....	15
2.2. Enfermedad cardiovascular.....	18
2.2.1. Epidemiología y etiología.....	19
2.2.2. Morfología de las arterias.....	21
2.2.3. El endotelio.....	23
2.2.4. Formación de la placa ateromatosa.....	24
2.3. Tocotrienoles y enfermedad cardiovascular.....	31
3. Objetivos.....	39
4. Metodología.....	40
4.1. Fase I: Caracterización del vehículo a utilizarse en los experimentos.....	40
4.1.1. Determinación del perfil de ácidos grasos en aceites.....	41
4.1.2. Determinación de las concentraciones de vitamina E en la materia prima para las dietas.....	42
4.2. Fase II: Experimentación animal.....	43
4.2.1. Ensayo 1.....	43
4.2.2. Ensayo 2.....	47
4.3. Fase III: Experimentación en humanos.....	49
4.4. Análisis estadístico.....	51
5. Resultados.....	54
5.1. Fase I, Caracterización del vehículo a utilizar en los experimentos.....	54
5.2. Fase II, Experimentación animal.....	56
5.2.1. Caracterización de las dietas preparadas para ser utilizadas en los ensayos con animales.....	56

5.2.2. Ensayo 1.....	61
5.2.2.1. Perfil lipídico.....	63
5.2.2.2. Porcentaje relativo de los ácidos grasos saturados e insaturados en las lipoproteínas del plasma.....	68
5.2.2.3. Concentración de vitamina E en plasma.....	69
5.2.2.4. Función endotelial.....	70
5.2.2.5. Formación de placa ateromatosa.....	71
5.2.3. Ensayo 2.....	72
5.2.3.1. Perfil lipídico.....	73
5.2.3.2. Capacidad oxidativa de las LDL.....	85
5.3. Fase III, Experimentación en humanos.....	87
5.3.1. Perfil lipídico.....	88
5.3.2. Capacidad oxidativa de las LDL.....	93
6. Discusión.....	95
7. Conclusiones.....	101
8. Perspectivas y recomendaciones.....	102
9. Declaración de conflicto de intereses.....	102
10. Referencias.....	103
11. Anexos.....	121

LISTADO DE FIGURAS

Figura #	Nombre	Página #
1	Estructura química del tocoferol.....	3
2	Estructura química del tocotrienol.....	4
3	Estructura molecular de los isómeros tocoferol y tocotrienol.....	4
4	Localización en la membrana y dinámica (tocoferol vs tocotrienol).....	5
5	Transporte de la vitamina E durante el catabolismo de quilomicrones y VLDL.....	6
6	Estructura secundaria (diagrama de cintas) de la proteína α -TTP.....	8
7	Dibujo esquemático de las interacciones entre RRR- α -TF y los residuos del bolsillo.....	9
8	Regulación hepática de la vitamina E.....	10
9	Mecanismo de degradación de la cadena lateral de los tocoferoles.....	11
10	Mecanismo de degradación de la cadena lateral de los tocotrienoles.....	11
11	Red antioxidante – Relación entre vitaminas E, C y ciclos tiol.....	13
12	Esquema de relaciones moleculares de los tocotrienoles...	14
13	Funciones fisiológicas de los tocotrienoles.....	15
14	Contenido de tocoferoles y sus isómeros en alimentos fuente.....	16
15	Contenido de T3E en fuentes naturales (mg/Kg).....	17
16	Contenido de tocotrienoles y sus isómeros en alimentos fuente.....	17
17	Representación grafica de la placa vs. "porridge".....	19
18	Esquema del sistema circulatorio.....	22
19	Morfología de la arteria.....	22
20	Diagrama de una arteria muscular normal.....	24
21	Diagrama del proceso de oxidación de las LDL.....	25
22	Adhesión de monocitos al endotelio mediante moléculas de adhesión.....	26

23	Diagrama del reclutamiento de las células del músculo liso para la formación de placa ateromatosa.....	27
24	Diagrama de la formación de la capa fibrótica de la lesión aterosclerótica.....	29
25	Diagrama de la lesión aterosclerótica complicadas y el proceso que contribuye a su formación.....	30
26	Esquema de los mecanismos celulares y moleculares que dan origen a la formación de placa ateromatosa.....	31
27	Mecanismo regulatorio del tocotrienol sobre síntesis de colesterol.....	32
28	Mecanismo propuesto para la regulación de síntesis de LDL por los tocotrienoles.....	34
29	Proceso esquemático: Regulación por parte de los T3E de la formación de placa ateromatosa.....	36
30	Esquema fases del estudio.....	40
31	Evolución de los pesos de los animales de experimentación por grupo de tratamiento.....	62
32	Distribución a posteriori de la media (A) y variabilidad (B) del perfil lipidico al inicio del estudio.....	63
33	Media de las variables del perfil lipidico en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento.....	65
34	Desviación estándar del perfil lipidico en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento.....	65
35	Distribución a posteriori del efecto de los tratamientos sobre el perfil lipidico, en relación con el efecto del aceite de girasol.....	67
36	Distribución a posteriori del efecto del momento de la evaluación sobre las variables del perfil lipidico.....	68
37	Porcentaje de relajación con ACH.....	70
38	Porcentaje de relajación con Nitroglicerina.....	71
39	Progresión de pesos en los diferentes grupos de tratamiento.....	72
40	Valores iniciales del perfil lipidico según grupo de tratamiento.....	73
41	Colesterol Media y Desviación estándar en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento.....	77
42	LDL Media y Desviación estándar en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento.....	78
43	HDL Media y Desviación estándar en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento.....	80

44	Distribución a posteriori del efecto de los tratamientos sobre el Colesterol Total, en relación con el efecto del aceite de oliva.....	82
45	Distribución a posteriori del efecto de los tratamientos sobre el LDL, en relación con el efecto del aceite de oliva.....	83
46	Distribución a posteriori del efecto de los tratamientos sobre el HDL, en relación con el efecto del aceite de oliva.....	84
47	Distribución a posteriori del efecto del momento de la evaluación sobre las variables del perfil lipídico.....	85
48	Cinética de la formación de dienos conjugados en LDL de conejos alimentados con dietas sin colesterol, con y sin adición de trigo.....	86
49	Cinética de la formación de dienos conjugados en LDL de conejos alimentados con dietas con colesterol, con y sin adición de trigo.....	87
50	Distribución a posteriori de la media del perfil lipídico al inicio del estudio.....	89
51	Distribución a posteriori del efecto del tipo de aceite sobre la variación (final –inicial) del perfil lipídico.....	91
52	Distribución a posteriori del efecto de la ingestión de grasa de la dieta sobre la variación (final –inicial) del perfil lipídico.....	92
53	Distribución a posteriori del efecto de la ingestión de vitamina E de la dieta sobre la variación (final –inicial) del perfil lipídico.....	93
54	Cinética de la formación de dienos conjugados en LDL de humanos.....	94

LISTADO DE TABLAS

Tabla #	Nombre	Página #
1	Sustituyentes del anillo aromático en la vitamina E.....	4
2	Factores de riesgo clásicos de la enfermedad cardiovascular.....	20
3	Factores de riesgo emergentes de la enfermedad cardiovascular.....	21
4	Resumen cronológico de resultados relevantes sobre el papel antiaterogénico de los tocotrienoles.....	36
5	Distribución de las grasas utilizadas según características.....	41
6	Ingredientes utilizados en la preparación de las dietas.....	48
7	Porcentaje relativo de ácidos grasos en los aceites utilizados en la preparación de las dietas.....	55
8	Vitámeros de vitamina E en los aceites utilizados en las dietas.....	56
9	Análisis proximal de las dietas preparadas para el ensayo 1.....	57
10	Porcentaje relativo de ácidos grasos de dietas preparadas en el ensayo 1.....	57
11	Análisis de la vitamina E en dietas preparadas en el ensayo 1.....	58
12	Análisis de la vitamina E en la harina de trigo.....	58
13	Análisis proximal de las dietas preparadas para el ensayo 2.....	59
14	Porcentaje relativo de ácidos grasos en las dietas preparadas en el ensayo 2.....	60
15	Análisis de la vitamina E en dietas preparadas en el ensayo 2.....	61
16	Descripción de los pesos en gramos durante los cuatro meses de tratamiento.....	62
17	Media de los valores de perfil lipídico al inicio y final del ensayo para cada uno de los tratamientos.....	64
18	AGS vs AGI al inicio y final del ensayo 1.....	69
19	Concentración Vitamina E al inicio y final del tratamiento.	69
20	Placa ateromatosa.....	71

21	Descripción de los pesos en gramos durante los cuatro meses de tratamiento.....	72
22	Perfil lipídico inicial cada grupo de tratamiento.....	74
23	Media de los valores de perfil lipídico al inicio y final del ensayo para cada uno de los tratamientos.....	76
24	Certidumbre de que cada uno de los tratamientos considerados presenten un efecto mayor al del aceite de oliva.....	81
25	Datos descriptivos de los sujetos por grupo de tratamiento, media (DE).....	88
26	Valores iniciales del perfil lipídico.....	88
27	Valores iniciales y finales del perfil lipídico.....	90

LISTADO DE ANEXOS

Anexo #	Nombre	Página #
1	Norma técnica ISO 5509-2000.....	121
2	Norma técnica ISO 5508-1990.....	151
3	Menú modelo dieta.....	163
4	Protocolo para la evaluación de proyectos de investigación/docencia en lo referente a manejo de animales de laboratorio – PUJ.....	164
5	Formato de recolección de peso de conejos y comida consumida.....	169
6	Consentimiento informado.....	170
7	Encuesta de salud, nutrición y alimentación.....	171
8	Diario de consumo.....	179
9	Modelos de alimentos de porciones promedio.....	181
10	Formato de conversión medidas caseras a unidades sistema métrico.....	182
11	Aplicativo excel desarrollado para análisis de dietas.....	183
12	Ensayo 1: modelación del efecto de los diferentes tratamientos.....	185
13	Ensayo 2: modelación del efecto de los diferentes tratamientos.....	187
14	Ensayo humanos: modelación del efecto de los diferentes tratamientos.....	189
15	Ensayo 1: perfil de ácidos grasos por tratamiento al inicio y final del ensayo.....	190
16	Ensayo 2: media y desviación estándar de los parámetros lipídicos por tratamiento.....	191

RESUMEN

Los tocotrienoles (T3E), además de ser antioxidantes presentan efecto hipocolesterolémico. Se encuentran en palmoleína y en algunos cereales. **Objetivo.** Definir el papel que los T3E de la dieta pudieran tener sobre el perfil lipídico y la capacidad oxidativa de las LDL. **Materiales y Métodos.** Se determinó el perfil de ácidos grasos y la concentración de T3E en ingrediente y dietas. Conejos fueron mantenidos con dietas con y sin T3E durante 4 meses. Mujeres jóvenes consumieron dietas con alto y bajo aporte de T3E durante un mes. Mensualmente, se determinó el perfil lipídico y al finalizar el tratamiento se determinó la capacidad oxidativa de las LDL. **Resultados.** Los tratamientos con AGM ó AGPI sin aporte de T3E produjeron efecto benéfico sobre los niveles de colesterol total y LDLc, pero disminuyeron los de HDLc. El tratamiento con AGS y con fuente natural de T3E, no produjo un efecto marcado sobre los niveles de colesterol total y LDLc y sí mejoró los niveles de HDLc. Al incluir T3E a dietas con colesterol, se observó un impacto benéfico sobre los niveles de los tres parámetros. Los T3E ejercen un efecto benéfico sobre la capacidad oxidativa de las LDL. **Conclusión.** La inclusión de T3E naturales de la dieta, sin importar su fuente, parecen disminuir o mantener neutro los niveles de colesterol sérico y limitar el incremento del mismo cuando a la dieta se le adiciona colesterol. Así mismo, tienen un impacto benéfico sobre los niveles de HDLc y sobre la capacidad oxidativa de las LDL.

ABSTRACT

Tocotrienols (T3E), besides being antioxidants exhibit hypocholesterolemic effects. They are in palmolein and some cereals. **Objective.** Define the role that dietary T3E could have on lipid profile and oxidative capacity of LDL. **Materials and Methods.** We determined the fatty acid profile and the concentration of T3E on ingredient and diets. Rabbits were maintained on diets with and without T3E for 4 months. Young women consumed diets high and low on T3E for a month. Monthly, lipid profile was determined. Oxidative capacity of LDL was determined at the end of the treatment. **Results.** MUFA or PUFA treatments without T3E produced beneficial effect on total cholesterol and LDLc levels, but decreased HDLc. Treatment with SFA and natural source of T3E, did not produce a marked effect on total cholesterol and LDLc levels and improved HDL levels. By including T3E to diets with cholesterol, we observed a beneficial impact on lipid profile parameters. The T3E exert a beneficial effect on the oxidative capacity of LDL. **Conclusion.** The inclusion of dietary T3E, regardless of its source, appear to decrease or maintain neutral serum cholesterol levels and limit the increase of it when dietary cholesterol is added. They also have a beneficial impact on HDLc levels and the oxidative capacity of LDL.

1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La enfermedad cardiovascular es reconocida a nivel mundial como una patología común, siendo la primera causa de muerte en el mundo occidental. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en 2004 murieron por esta causa 17.3 millones de personas, igualmente, calcula que en el 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por enfermedad cardiovascular (ECV).

En Colombia, las muertes por enfermedades cardiovasculares casi que se han duplicado en 25 años. Según el DANE las muertes por ECV fueron la primera causa de muerte en el 2009, siendo responsables del 27% del total de las causas, pasando de 30 mil muertes en 1980 a 52 mil en el 2009. La tasa de mortalidad del 2009 por ECV se ubicó en 128 por 100.000 habitantes.

Desde su descubrimiento se han descrito múltiples mecanismos para describir este complejo fenómeno, dentro de los cuales encontramos dislipidemia y el estrés oxidativo. La dislipidemia se puede definir como un desorden en el metabolismo de las lipoproteínas que conduce a valores anormalmente bajos o altos de una o más de ellas, manifestándose con niveles elevados de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG) o disminuidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). La dislipidemia es una enfermedad multifactorial que está determinada tanto por factores modificables como no modificables. Dentro de los primeros, la dieta y nutrición se destaca como el mayor factor determinante en la aparición de esta enfermedad por lo cual ocupa un papel preponderante en su prevención y tratamiento.

Los antioxidantes están íntimamente relacionados con el daño celular puesto que interactúan con los radicales libres y terminan la reacción en cadena antes de que la molécula sufra un daño no reversible. Ellos neutralizan los radicales libres mediante la donación de uno de sus electrones, sin volverse en si mismo radicales libres, puesto que son estables en cualquiera de las dos formas, por lo cual actúan como “scavengers” y ayudan a prevenir daño celular que puede conllevar a desarrollar algunas enfermedades como la cardiovascular.

Vitamina E, término genérico que cubija una familia de compuestos (4 tocoferoles y 4 tocotrienoles) que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano, es reconocida como un antioxidante potente. Sin embargo, es importante anotar que la mayoría de las investigaciones desde su descubrimiento en 1936 se ha centrado en los tocoferoles. Solo desde la década de los 80's algunos investigadores han dedicado sus esfuerzos al estudio de los tocotrienoles y el importante papel que estos juegan en la salud humana puesto que no sólo son un antioxidante más potente que los tocoferoles, sino que adicionalmente se ha descrito su papel en la disminución del riesgo cardiovascular debido entre otros, a su capacidad hipocolesterolemica y de reducción de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio.

Diversos estudios a nivel mundial tanto en animales como en humanos han demostrado que los tocotrienoles (T3E) tienen un efecto hipocolesterolemico, antitrombótico y favorecen la regresión de placas ateromatosas haciendo su estudio interesante por la potencial disminución de riesgo de ECV que podría resultar de su consumo. Sin embargo, es importante resaltar que la mayoría, por no decir la totalidad de los estudios

realizados a nivel mundial en animales se han realizado con dietas modulares y en humanos utilizando capsulas ricas en ellos (*Palmvitee*) y ninguno ha descrito el papel que juegan los T3E que vienen naturalmente en los alimentos sobre el riesgo cardiovascular.

Hasta el día de hoy, el tratamiento para la ECV se ha basado en una aproximación que incluye una dietaria restrictiva y un tratamiento farmacológico. La primera se centra en la disminución de los alimentos fuentes de ácidos grasos saturados y colesterol como son mariscos, huevo, leche entera y productos lácteos derivados de ella y carnes rojas no magras, lo cual produce una dieta monótona y limitada en fuentes proteicas de origen animal (NCEP 2002) . Por otro lado, el tratamiento farmacológico se ha basado en inhibidores de la absorción del colesterol dietario como es colestercamina ó inhibidores de la síntesis hepática del colesterol con las estatinas (Ministerio de Salud 2000). Adicionalmente, en los últimos años se ha incluido el uso de antioxidantes como - tocoferol y resveratrol como complemento dietético con resultados positivos en la disminución de riesgo cardiovascular (Stephens 1996; GISSI 1999; The HOPE Study Investigators 2000; Schwenke 2002; Tosca 2005)

Por todo lo anterior, y teniendo en cuenta que el colesterol juega un papel importante en la formación de placa es importante buscar medios para disminuirlo y por ende prevenir la peroxidación de las LDL. Idealmente, esta manipulación debería ser con la dieta, pero hasta el día de hoy la evidencia científica nos ha demostrado que la mejor aproximaciones a este manejo es una dieta mediterranea, rica en aceite de oliva, la cual no solo es ajena a los hábitos de la población Colombiana, sino que es poco disponible puesto que no existe una producción nacional del producto lo cual eleva los costos.

En caso de poder encontrar que la inclusión de alimentos fuente de T3E en la dieta Colombiana disminuye el riesgo de ECV, medido como disminución de algunos indicadores de riesgo, se podría dar una nueva herramienta a los profesionales de la salud para hacer modificaciones en los hábitos alimentarios de los individuos que disminuyan el riesgo al desarrollo de una de las patologías que en este momento tiene mayor impacto económico sobre el gasto de salud en el país.

Teniendo en cuenta lo anterior se planteo como **problema de investigación** la siguiente pregunta:

¿La introducción de tocotrienoles naturales en la dieta producirá efecto benéfico sobre el perfil lipidico y la capacidad oxidativa de las LDL?

Consecuentemente con el problema de investigación se planteo la siguiente **hipótesis de investigación**:

La introducción de los tocotrienoles a la dieta usual mediante la utilización de un vehículo natural produce cambios benéficos en el perfil lipidico y disminución en la capacidad oxidativa de las LDL.

2. MARCO TEORICO

2.1. La vitamina E:

El término “vitamina E” fue inicialmente acuñado por Evans y Bishop en 1922, para describir un nuevo factor nutricional indispensable para la reproducción normal. La gran diversidad en isómeros de la vitamina E se empezó a describir en 1936, cuando Evans y Emerson caracterizaron y aislaron dos compuestos con “actividad de vitamina E” del aceite de germen de trigo. Estos compuestos fueron designados como α y β tocoferol, proveniente de la expresión griega “tokos” (nacimiento) y “phorein” (acarrear). En los subsiguientes años, tanto los isómeros δ y γ del tocoferol (Emerson 1937; Stern 1947), como los tocotrienoles fueron descritos (Pennock 1964). En 1968, el “American Food and Nutrition Board” reconoció oficialmente a la vitamina E como un nutriente esencial.

2.1.1. Estructura:

A diferencia de otras vitaminas, que presentan una sola estructura química, bajo el nombre de vitamina E se agrupan dos conjuntos de compuestos químicamente muy similares: los tocoferoles (TF) y los tocotrienoles (T3E), con estructura básica tocol o 2-metil-2-(4',8',12'-trimetiltridecil)-6-cromanol.

Los tocoferoles, poseen una cadena poliprenilo saturada de 16 carbonos y tres centros quirales con configuración R en las posiciones 2R, 4' y 8' (Figura 1). Los miembros del segundo grupo, tocotrienoles, poseen una cadena con tres insaturaciones en las posiciones 3', 7' y 11' (Figura 2). La Figura 3 muestra una representación del modelo molecular de las dos familias.

Los miembros de cada grupo son denominados α , β , γ , y δ dependiendo del número y de la posición de los grupos metilo sustituyentes del anillo aromático (Tabla 1) (Azzi 2000).

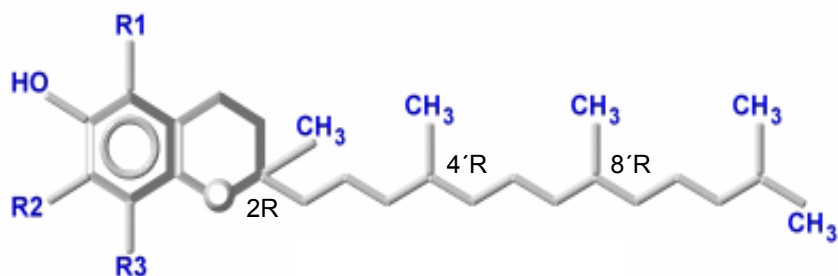


Figura 1: Estructura química del tocoferol

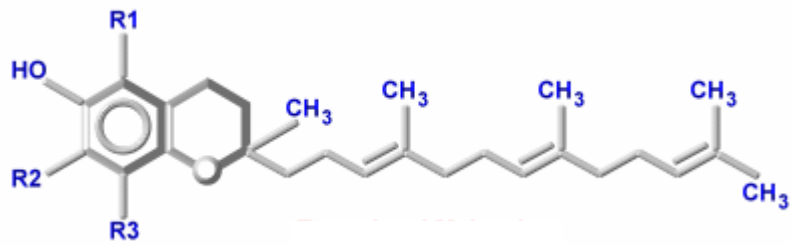


Figura 2: Estructura química del tocotrienol

Tabla 1: Sustituyentes del anillo aromático en la vitamina E

	R1	R2	R3
α - tocoferol/tocotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β - tocoferol/tocotrienol	CH ₃	H	CH ₃
γ - tocoferol/tocotrienol	H	CH ₃	CH ₃
δ - tocoferol/tocotrienol	H	H	CH ₃

Tomado de: IUPAC-IUB, 1982

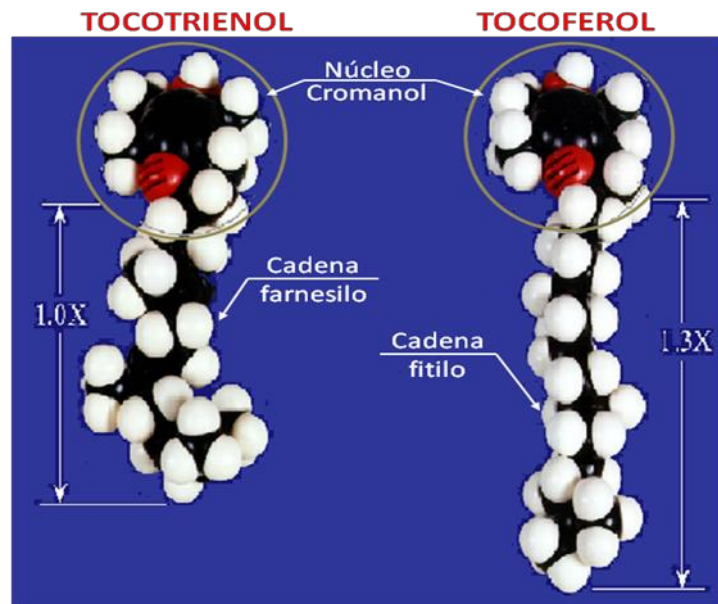


Figura 3: estructura molecular de los isómeros tocoferol y tocotrienol

Adaptado de: http://www.drpasswater.com/nutrition_library/tan_1.html

Debido a que los tocoferoles poseen 3 centros quirales, ellos pueden existir como 8 diastereoisómeros o 4 pares de enantiómeros. En la naturaleza, el α -TF ocurre en la

configuración 2R, 4'R, 8'R por lo cual se llama, (2R, 4'R, 8'R)- α -tocoferol ó RRR- α -tocoferol (d- α -TF). El diastereoisómero (2S, 4'R-, 8'R)- α -tocoferol fue llamado l- α -TF y posteriormente renombrado como 2-*epi*- α -TF.

Por el contrario, los tocotrienoles al no tener sino un centro quiral en la posición 2R, se presentan naturalmente en los alimentos únicamente en la configuración 2R, 3'-*trans*, 7'-*trans*. (Nelis 2000)

Es importante resaltar las desviaciones en el eje que presenta el T3E, similares a las que se pueden observar en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), lo cual hace que su papel en las membranas celulares difiera de las de los TF debió que le permite una mayor penetrabilidad en las membranas altamente saturadas como son las del cerebro e hígado (Suzuki 1993). (Figura 4)

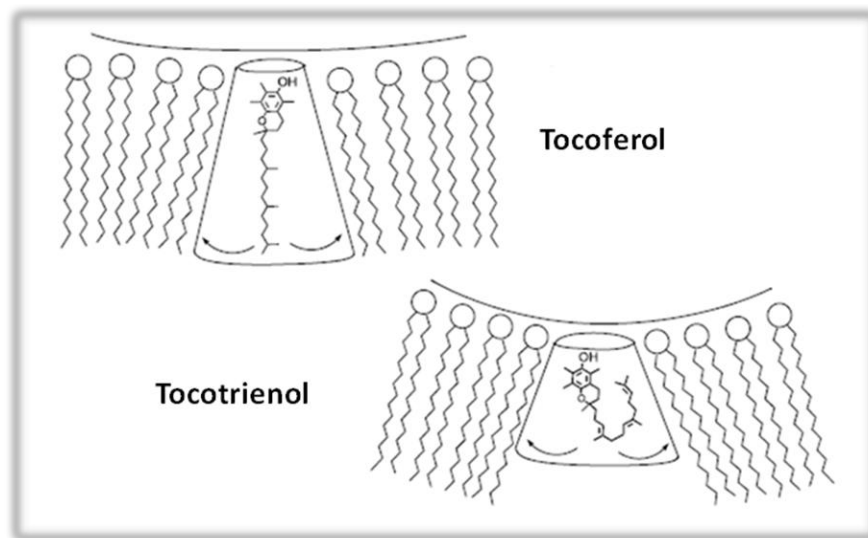


Figura 4: localización en la membrana y dinámica (tocoferol vs tocotrienol)
Tomado de: Chandan, 2007

2.1.2. Absorción, transporte, captación celular y metabolismo

Como consecuencia de su hidrofobicidad, la vitamina E necesita de un sistema de transporte en los sistemas acuosos como plasma y líquidos corporales y, por tanto, se transporta en las lipoproteínas unidas a los lípidos de la dieta (Lewis 1954; Fairus 2006).

A continuación se presenta un resumen de los procesos de absorción, transporte y utilización de la vitamina E, sin embargo, vale la pena aclarar que la mayoría de la información disponible se centra en los tocoferoles y muy poco se ha descrito en cuanto a dichos mecanismos con respecto a los tocotrienoles.

La absorción intestinal de vitamina E en humanos ha sido estimada en cerca del 70%, basada en la recuperación fecal de α -TF radioactivo (Kelleher 1970). En los humanos, los

ocho isómeros de la vitamina E son absorbidos en la parte proximal del intestino (Ikeda 1996) y este proceso es dependiente de los lípidos dietarios, la bilis y las esterasas pancreáticas. Se emulsifica con los otros componentes lipídicos de la dieta y forma parte de las micelas mixtas que se absorben mediante difusión pasiva en el borde en cepillo de los enterocitos. Traber y col. en 2004 postularon la hipótesis que la absorción intestinal de la vitamina E puede involucrar un complejo mecanismo similar al descrito para la absorción de colesterol. Sin embargo, el mecanismo de absorción específico de los T3E aun no está totalmente claro, a pesar de que se han realizado varios estudios en humanos (Fairus 2006).

La vitamina E, junto con los triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y apoproteínas forman los quilomicrones en el aparato de *Golgi* de las células de la mucosa (Traber 1996; Brigelius-Flohe 1999). Los quilomicrones eventualmente se secretan al sistema linfático de donde pasan al torrente sanguíneo vía ducto torácico (Hollander 1975). Una pequeña parte de la vitamina E es captada por los tejidos extra hepáticos, principalmente tejido adiposo y muscular, durante el catabolismo de los quilomicrones por acción de la lipoproteína lipasa (LPL) (Abe 2007) y la restante, la mayor parte, es transportada al hígado por los remanentes de quilomicrón. (Traber 1985).

Durante la formación de los remanentes de quilomicrón, algunos componentes, entre ellos la vitamina E, son transferidos a las HDL. Simultáneamente, parte de los ésteres de colesterol de las HDL son transferidos a los remanentes mediante la participación de la enzima de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (Morton 1983). Posteriormente, las HDL pueden transferir la vitamina E adquirida a las otras lipoproteínas circulantes (Traber 1992). (Figura 5). Los remanentes de quilomicrón que han adquirido la Apolipoproteína E (Apo E) de las HDL son captados por el hígado por procesos mediados por receptores.

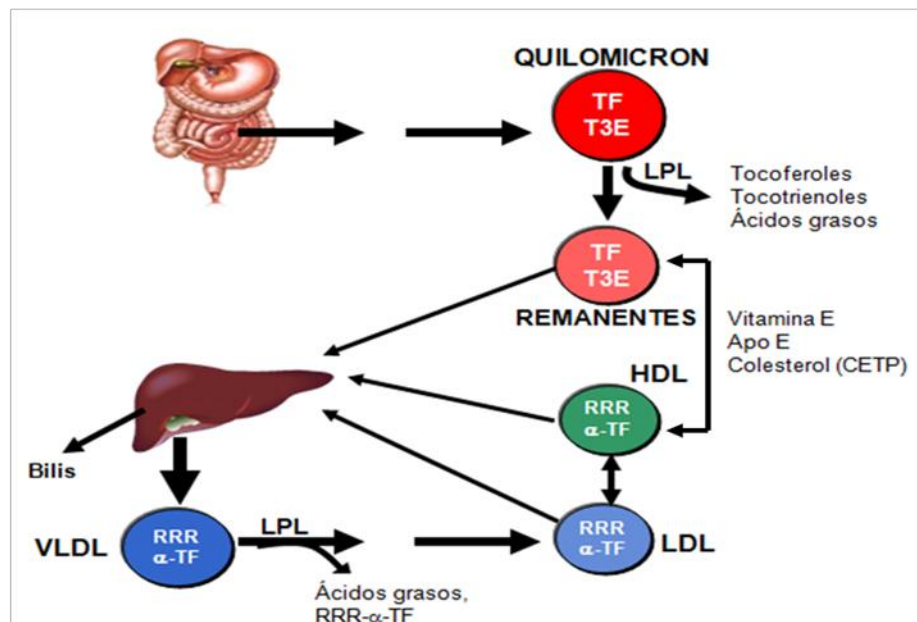


Figura 5: Transporte de la vitamina E durante el catabolismo de quilomicrones y VLDL
Adaptada de: Kayden 1993

Una vez se encuentran en el hígado, los quilomicrones se degradan en los lisosomas permitiendo que la vitamina E tome diferentes destinos metabólicos. Una parte se liga a la proteína citosólica transportadora del α tocoferol (α -TTP), proteína de 32 kDa, miembro de la familia Sec14 que se expresa principalmente en el hígado. El gen que codifica para esta proteína está localizado en la región 8q13.1 del cromosoma 8. Aun cuando el mecanismo exacto por medio del cual la α -TTP regula el tráfico intracelular y la secreción del α -TF a las VLDL no ha sido completamente explicado, parece ser que es la responsable de la discriminación entre las diferentes formas de la vitamina E y la posterior incorporación del α -TF en las VLDL y por lo tanto de la regulación de los niveles plasmáticos de la vitamina (Kaempf-Rotzoll 2003). La información disponible actualmente sugiere que la α -TTP posee un bolsillo que reconoce los hidroxilos libres, los 3 grupos metilo del anillo cromanol y la conformación de la posición 2 de la cadena fitilo del RRR- α -TF (Figura 6), lo cual hace que la afinidad de la α -TTP por el α -TF sea del 100%, mientras que la afinidad por el α -T3E es solo del 12% (Hosomi 1997); desafortunadamente, la afinidad exacta de la α -TTP por los otros isómeros de T3E aun no ha sido totalmente determinada.

Profundizando en la estructura de la α -TTP y su interacción con la vitamina, se puede decir que el bolsillo que liga la vitamina está formado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos, con excepción de las Ser136 y 140, y tres moléculas de agua. Una de estas moléculas conecta el hidroxilo fenólico del tocoferol mediante un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de la Val 182. El grupo metilo de la posición 5 del anillo encaja cómodamente en un nicho formado por las cadenas laterales de los residuos Ile194, Val191, Ile154 y Leu183, las últimas dos, mediante fuerzas de van der Waals, a una distancia de 3.6Å°. Por el otro lado, los grupos metilo en la posición 7 y 8 del anillo entran en contacto con los residuos Phe187, Phe133 y Leu137. Así mismo, la conformación geométrica que toma el estereoisómero R en la posición 2 del anillo, permite que el grupo metilo penetre la cavidad formada por los residuos Phe133, Val182 e Ile179. Finalmente, la cadena lateral se dobla formando una U envolviendo los centros quirales de las posiciones 4' y 8' (Meier 2003; Min 2003) (Figura 7)

Las VLDL en circulación ricas en RRR- α -TF, son catabolizadas por la acción de la LPL en forma similar a como ocurre con los quilomicrones. Parhofer y col en 1991 reportaron que aproximadamente el 50% de las VLDL son parcialmente catabolizadas y retornan al hígado, mientras que las restantes son convertidas en LDL. Es así como la vitamina E que se secreta con las VLDL puede tener diversos destinos: (1) ser transferida a las HDL durante la lipólisis, (2) formar parte de las LDL resultantes del catabolismo de las VLDL y (3) retornar al hígado con los remanentes de VDL.

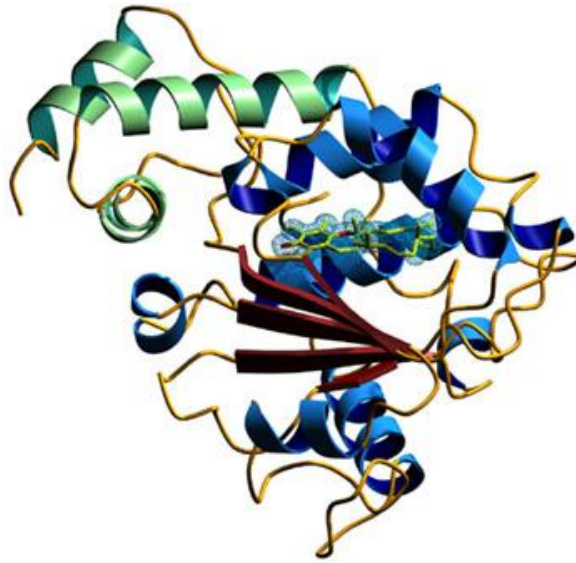


Figura 6: Estructura secundaria (diagrama de cintas) de la proteína α -TTP visto desde la hoja b. El α -TF se presenta de color amarillo. El dominio N-terminal se indica en verde y el C en azul y sus hojas beta en rojo

Tomado de: Min, 2003

La vitamina E presente en las LDL puede ser posteriormente captada por los tejidos que poseen receptores de LDL (Traber 1984). Sin embargo, estudios realizados por Cohn y col en 1989 postularon que la distribución del α -TF a los diferentes tejidos es redundante debido a que los conejos Watanabe que tienen receptores LDL deficientes poseen niveles normales de esta vitamina.

El transporte de la vitamina E desde los tejidos periféricos hacia el hígado no ha sido estudiado en detalle, pero parece ocurrir mediante las HDL de forma similar a como ocurre el transporte inverso del colesterol (Herrera 2001).

A medida que avanza el conocimiento sobre la vitamina E, se han determinado diversos mecanismos regulatorios que controlan los niveles plasmáticos y previenen su acumulación. Hasta el momento se han descrito diferentes proteínas ligadoras del tocoferol (TBP por su nombre en inglés tocopherol binding proteins) con diversos grados de afinidad. De todas ellas, la más estudiada ha sido la α -TTP previamente descrita, pero existen otras no menos importantes y si menos estudiadas como la TAP (tocopherol associated protein) descrita por Stocker y col en 1999 y otra a la cual no se le ha asignado nombre, descrita por Dutta-Roy y col en 1993.

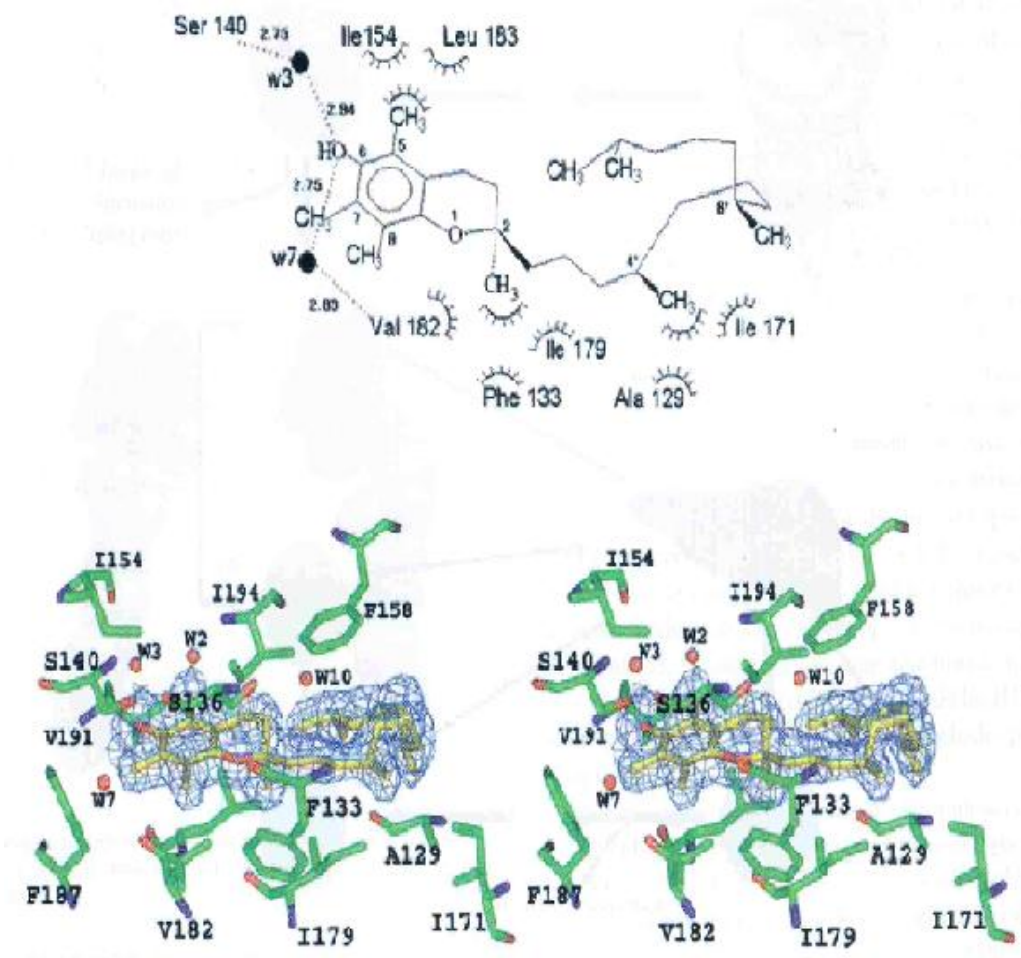


Figura 7: Dibujo esquemático de las interacciones entre RRR- α -TF y los residuos del bolsillo. Los posibles puentes de hidrógeno y contactos se esquematizan con líneas punteadas y los contactos de van der Waals con arcos.

Tomada de: Meier y col, 2003

La TAP es una proteína citosólica de 46 kDa que fue originalmente descrita en hígado bovino y posteriormente en humano. Se expresa principalmente en hígado, cerebro y próstata. Es de resaltar que esta proteína fue renombrada en el 2001 por Shibata y col como Blotch's supernatant protein factor (SPF); sin embargo, aún cuando se conoce que liga tocoferol, su papel aún no ha sido claramente establecido. Se ha estudiado más su papel en la biosíntesis de colesterol, encontrándose que estimula la conversión de escualeno a epóxido de escualeno (Porter 2003). En cuanto a la proteína (14.2 kDa) descrita por Dutta-Roy y col en 1993, hasta el momento sólo se ha logrado parcialmente su secuenciación y no se ha descrito su función, razón por la cual no es claro si se trata de una nueva proteína ligadora del tocoferol o es un producto de la degradación de la α -TTP.

A diferencia de otras vitaminas liposolubles, la vitamina E no se acumula en el hígado en niveles tóxicos, lo cual permite pensar que tanto el exceso de α -TF como los otros isómeros de la vitamina se excretan en la bilis o en orina utilizando dos diferentes mecanismos: (1) Las cantidades excesivas de vitamina E que llegan al hígado en los remanentes de quilomicrón pueden tomar la vía endosoma/lisosoma siendo de esta forma eliminada en la bilis; (2) puede ser metabolizada en el hígado a carboxietil hidroxichromano (CEHC) y sus precursores, carboximetilbutil hidroxichromano (CMBHC) para ser eliminada en la orina. (Figura 8)

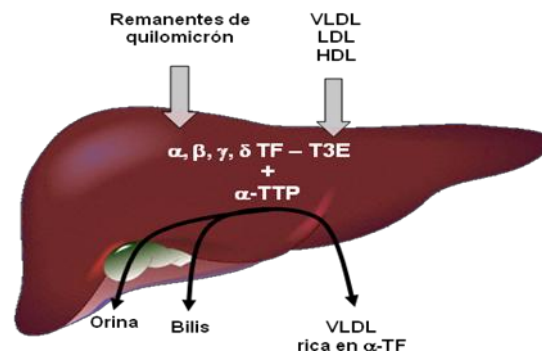


Figura 8: Regulación hepática de la vitamina E

La vitamina E se metaboliza de una forma similar a los xenobioticos ya que el paso inicial para la eliminación urinaria es la oxidación a hidroxilo de uno de los metilos terminales a través de la acción de las enzimas CYP4F2 y CYP3A4 y del sistema citocromo P450 (Sontag 2002).

Algunos autores han denominado este paso ω -oxidación por su analogía con el mecanismo que ocurre con los ácidos grasos. Posteriormente ocurre la remoción de bloques de 2 ó 3 carbonos mediante β -oxidación, seguida de la conjugación y excreción (Figuras 9 y 10) (Birringer 2002; Zhou 2004; Hacquebard 2005). El metabolito CEHC es excretado en la orina previa solubilización con ácido glucurónico o sulfato (Frank 2004; Freiser 2009).

El metabolismo de los tocotrienoles es un poco más complicado que el de los tocoferoles debido a la insaturación de su cadena lateral, razón por la cual, durante la segunda y cuarta vuelta de la β -oxidación se necesitan 2 enzimas auxiliares (2,4-dienoil-CoA-reductasa y 3,4-enoil-CoA isomerasa), de forma similar a como ocurre en la β -oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Lodge 2001; Birringer 2002).

Los isómeros γ del TF y T3E son más activamente metabolizados a CEHCs que la forma α (Traber 2005)

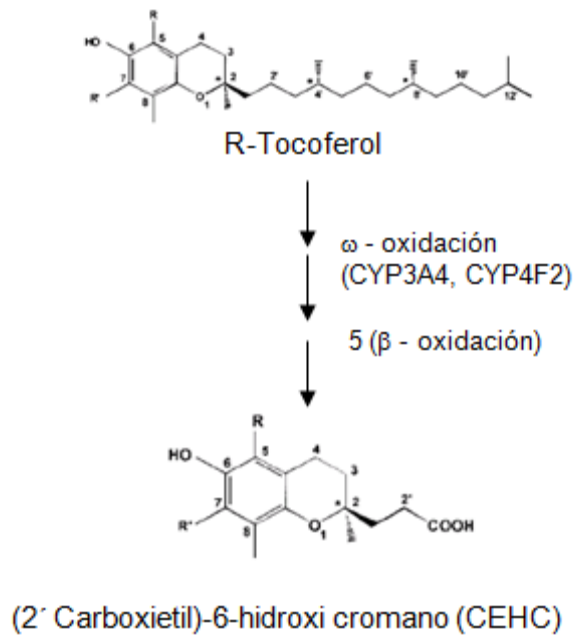


Figura 9: Mecanismo de degradación de la cadena lateral de los tocoferoles. Se utiliza R tocoferol para simbolizar cualquiera de los isómeros
Adaptada de: Birringer 2002

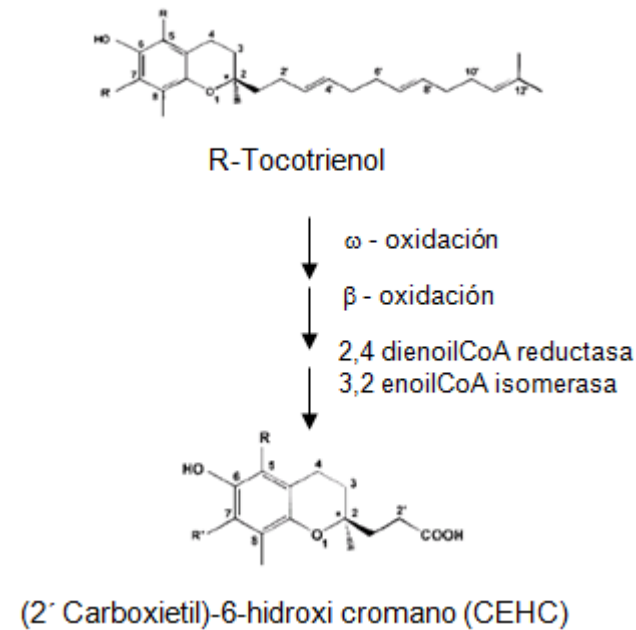


Figura 10: Mecanismo de degradación de la cadena lateral de los tocotrienoles. Se utiliza R-tocotrienol para simbolizar cualquiera de los isómeros.
Adaptada de: Birringer 2002

2.1.3. Funciones

Cuando Evans y Bishop estudiaron la duración del ciclo estral en ratas de laboratorio como respuesta a cambios en la dieta descubrieron que la ausencia de lo que ellos llamaron "factor X", posteriormente nombrada vitamina E, resultaba en la muerte fetal y posterior reabsorción (Evans y Bishop 1922). Durante los siguientes años se describieron diversos síndromes causados por su deficiencia en varias especies pero no se le pudo asignar una función específica (Mason 1977). Décadas más tarde se descubrió su potencial antioxidante y se asumió que ésta era su principal función *in vivo* (Kamal-Eldin 1996; Brigelius-Flohé 1999). Sin embargo, recientemente se han descrito otras funciones biológicas que no están relacionadas con su función antioxidante; éstas incluyen señalización celular, expresión génica, respuesta inmune y apoptosis (Azzi 2002; Brigelius-Flohé 2002).

2.1.3.1. Protección contra radicales libres formando parte de la red antioxidante (vitaminas E, C y ciclo tiol) del cuerpo humano.

La formación excesiva de radicales libres, causada por un desbalance del proceso oxidativo-antioxidativo, conlleva a estrés oxidativo (Sies 1997) el cual se cree es la base para diversas enfermedades degenerativas como aterosclerosis, enfermedad cardiovascular (ECV), trombosis, cáncer, artritis y Alzheimer's. Así mismo, se ha postulado que el estrés Oxidativo es la causa y no la consecuencia de la Diabetes Mellitus (Ceriello 2004).

El cuerpo se defiende del daño oxidativo a través de una red antioxidante en la cual la vitamina E juega un papel central (Packer 2002), siendo así que el α -TF es reconocido como el principal compuesto liposoluble antioxidante del cuerpo humano (Burton 1982) el cual bloquea la progresión de la peroxidación lipídica causada por radicales libres conllevando a proteger las lipoproteínas y las membranas biológicas (Kamal-Eldin 1996; Brigelius-Flohé 1999; Packer 2002).

La vitamina E no actúa sola sino que por el contrario hace parte de una red como lo muestra la Figura 11.

En cuanto a la capacidad antioxidante de los T3E, Packer y col al inicio de la década de los 90's realizaron una serie de ensayos en los cuales demostraron que los T3E tenían un potencial 40-60 veces mayor que los TF (Serbinova 1991; Suzuki 1993; Serbinova 1994), posiblemente debido a que (Suzuki 1993; Packer 2001):

- se ubican más en la superficie de la membrana lo cual facilita el reciclaje del radical cromanol
- poseen una distribución más uniforme en la bicapa lipídica de las membranas celulares
- tienen un mayor potencial de producir desorden en los lípidos de la membrana, lo cual favorece la interacción del anillo cromanol con los radicales libres.

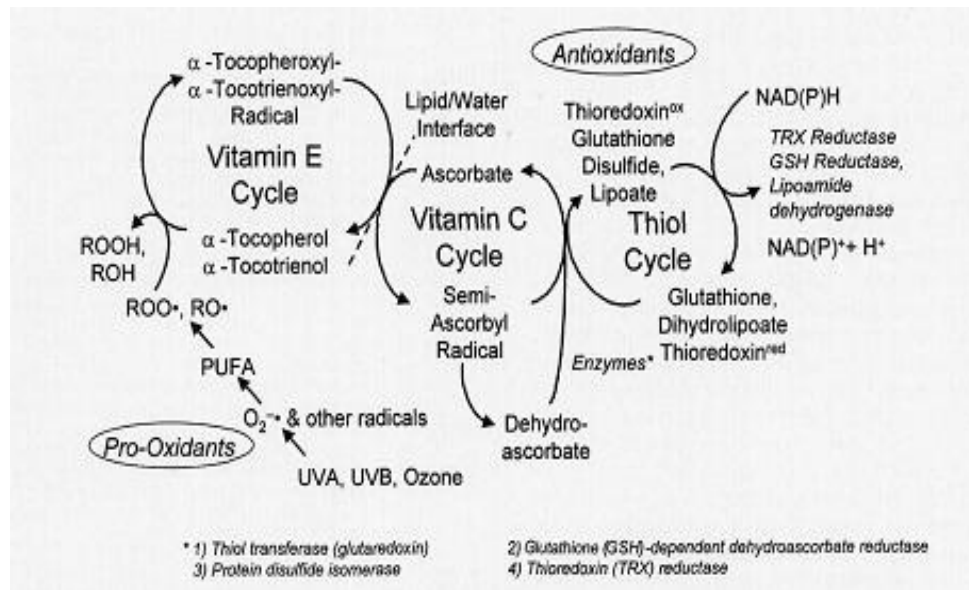


Figura 11: Red antioxidante – Relación entre vitaminas E, C y ciclos tiol
 Tomado de: Packer, 2001

2.1.3.2. Funciones no relacionadas con el papel antioxidante

Diversos estudios han demostrado que los 8 isómeros de la vitamina modulan la actividad de diversas enzimas involucradas en la transducción de: protein cinasa C, protein cinasa B, tirosina cinasas, 5-, 12-, and 15-lipooxigenasas, cyclooxygenasa-2, fosfolipasa A2, fosfatasa 2A, tirosina fosfatasa, y diacilglicerol cinasa (Zingg 2007).

Diversos estudios han demostrado que los isómeros α - y γ -TF inhiben la proliferación de las células musculares lisas y la agregación plaquetaria mediante la inhibición de la proteína cinasa C (PKC). Adicionalmente, el α -TF disminuye la producción de citocina proinflamatoria, mediante la inhibición de la vía de la 5-lipooxigenasa y el γ -TF inhibe la actividad de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Azzi 2000; Ricciarelli 2002; Rimbach 2002).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los T3E cumplen diversas funciones no antioxidativas que no comparten con los TF. Por ejemplo (Figura 12):

Finalmente, es importante resaltar que diversos estudios han demostrado que cada isómero tiene una actividad diferente, siendo así que el γ y δ -T3E exhiben mayor poder anticancerígeno que los isómeros α y β .

- Finalmente, las investigaciones han demostrado que los TF no comparten la actividad hipocolesterolemizante que tienen los T3E (Qureshi 1986; Qureshi 2002), tema que por ser el centro de este documento, se discutirá detalladamente más adelante.

Todo lo anterior refleja su importancia en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (Figura 13).

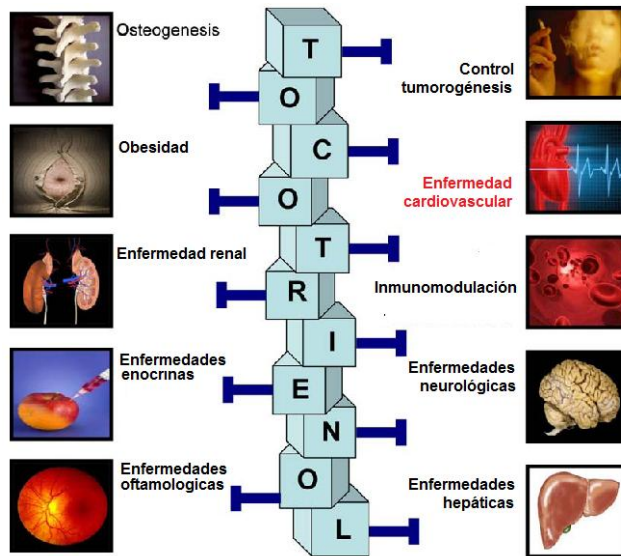


Figura 13: Funciones fisiológicas de los tocotrienoles
Adaptado de: Aggarwal, 2010

2.1.4. Alimentos fuente

Los tocoferoles y tocotrienoles son sintetizados únicamente en organismos fotosintéticos. Las plantas acumulan los TF en semillas oleaginosas, hojas y otras partes verdes de las plantas. El α -TF se encuentra principalmente en los cloroplastos de las células vegetales, mientras que sus homólogos β , γ y δ se encuentran principalmente en las semillas. Por su parte, los T3E se encuentran en la corteza y en el germen de algunas semillas y cereales.

Puesto que la vitamina E y sus componentes, los TF y los T3E, no son sintetizados por los animales ni los seres humanos, estos deben ser obtenidos de las plantas en donde se encuentran los ocho isómeros. Sin embargo, el α -TF y en menor cantidad el γ -TF son los únicos isómeros que han sido reportados en pequeñas cantidades en los tejidos animales (Nelis 2000).

El estudio de consumo de alimentos realizado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos en 1988, reportó que las principales fuentes de vitamina E en forma de

TF de la población Norteamericana son aceites, margarina, mayonesa, aderezos para ensaladas, cereales para desayuno fortificados y mantequilla de maní (US Department of Agriculture 1990).

Los vegetales tienen un muy bajo contenido de TF, siendo así que con excepción de la espinaca congelada, ningún otro vegetal logra el aporte de 1 mg de TF por 100 g de parte comestible. Igualmente la mayoría de las frutas son una fuente muy pobre de este nutriente, sin embargo, dentro de estas, vale la pena resaltar el aporte de los duraznos secos que contienen 6.2 mg de α -TF/100 g comestibles. Por otro lado, las nueces y semillas como las almendras, nueces del Brasil, avellanas, maní y semillas de girasol y sus aceites son una buena fuente de vitamina E. Sin embargo, la mejor fuente de TF es el germen de trigo, aportando aproximadamente 2000 mg/100 g comestibles (Figura 14)

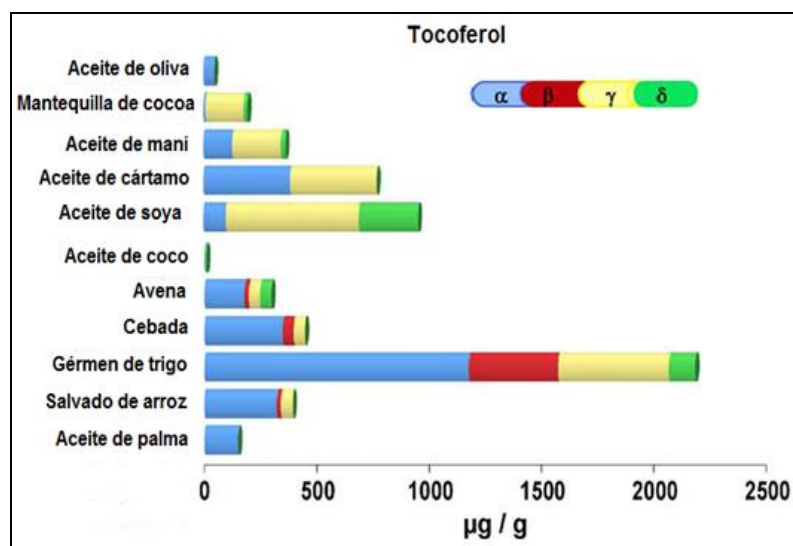


Figura 14: Contenido de tocoferoles y sus isómeros en alimentos fuente
Adaptado de: Aggarwal, 2010

La vitamina E en las dietas occidentales se obtiene principalmente de aceites, margarinas, mayonesa, aderezos de ensaladas y de alimentos fortificados como cereales y jugos. Contrario a lo que ocurre en otras comunidades occidentales en donde el principal isómero consumido es α -TF, en Estados Unidos es el γ -TF debido al alto consumo de soya y maíz (Packer 2002)

En cuanto al contenido de los T3E en los alimentos, Ong y col en el 1993 reportaron que estos se encuentran en cereales como el trigo, cebada, centeno y arroz, aceite de palma y aceite de germen de trigo (Figura 15). Así mismo, es importante resaltar la proporción de isómeros que contiene cada uno puesto que diversos estudios han reportado diferencia en la actividad biológica de cada uno de ellos (Aggarwal 2010) (Figura 16).

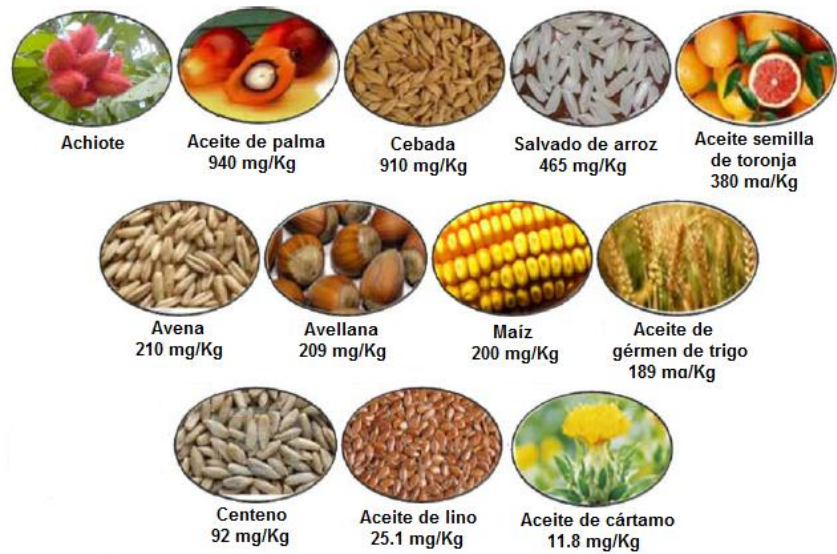


Figura 15: Contenido de T3E en fuentes naturales (mg/Kg)
Adaptado de: Aggarwal, 2010

Finalmente, es importante tener en cuenta que la mayoría de la información nutricional contenida en las Tablas de Composición de Alimentos está dada para alimentos crudos y que la vitamina E se reporta en forma de tocoferol (equivalentes de α -TF) y este reporte no incluye el contenido de T3E.

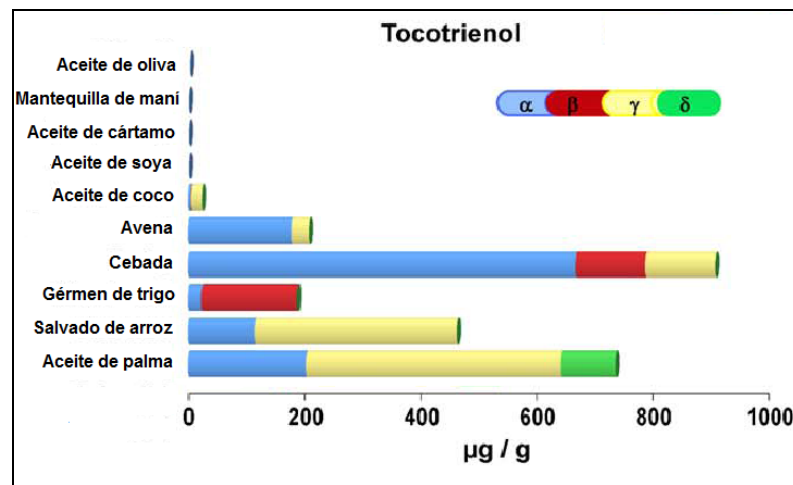


Figura 16: Contenido de tocotrienoles y sus isómeros en alimentos fuente
Adaptado de: Aggarwal, 2010

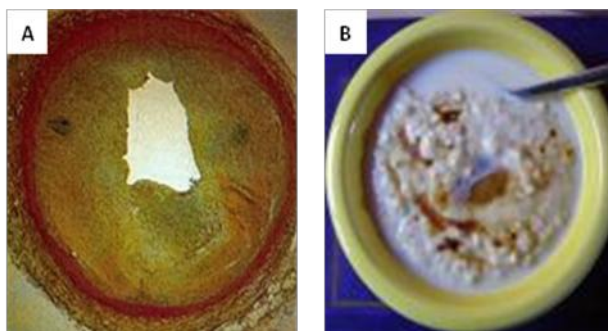
2.2. Enfermedad cardiovascular:

La aterosclerosis no es una enfermedad nueva. Estudios morfológicos de momias egipcias realizados a principios del siglo XX, mostraron lesiones ateroscleróticas en momias de los faraones que vivieron hace más de 3500 años. Hipócrates (469-377 A.C.) describió la muerte súbita (cardiaca). Así mismo, Aristóteles y sus contemporáneos (400 A.C.) discutieron esta enfermedad según reporte realizado por Smith en 1960. Posteriormente, Falopio en 1575 reportó hallazgos patológicos de arterias que él describió como “degeneración a hueso”, sugiriendo la presencia de procesos de calcificación en dichas arterias. La relación entre lesión coronaria y síntomas de *angina pectoris* fue postulada en 1799 por Parry, sin embargo, solo hasta 80 años más tarde Potain identificó esta *angina pectoris* como el resultado de la isquemia del miocardio.

La condición grasa de las lesiones fue enfatizada hace más de un siglo por Vogel y col quienes identificaron al colesterol como el mayor componente de la placa. Esta observación fue posteriormente complementada por Aschoff en 1907, quien utilizando el conejo como modelo animal, describió lo que en su momento llamó “Cholesterinesterophagozyten” y hoy se conoce como célula espumosa derivada de macrófagos.

Cuando se estudia la enfermedad arterial se encuentra que los autores utilizan indiscriminadamente diversos términos: ateroma, ateromatosis, arterioesclerosis y aterosclerosis. La palabra ateroma fue creada por Celsus hace 2000 años con el significado de tumor graso y se usó hasta mediados del siglo XIX. La palabra ateromatosis apareció en 1815 cuando Hodgson la utilizó para describir la degeneración grasa de las arterias sin que necesariamente se presente endurecimiento de ellas. El término arterioesclerosis fue acuñado por primera vez en 1835 por Lobstein en su libro “Lehrbuch del pathologischen Anatomie” y significa endurecimiento de las arterias. Posteriormente, en 1904, Marchand sugirió la utilización de la palabra aterosclerosis la cual fue adoptada y se utiliza actualmente para describir la acumulación grasa en las arterias con posterior endurecimiento de ellas.

El término aterosclerosis viene del griego *ἀθήρα* que significa “sopa con grumos o porridge en inglés”, debido a la consistencia suave del centro de la placa, y *sclerosis* que significa endurecimiento. (Figura 17). Es interesante recalcar que el término pretende no solo describir la fase inicial de depósito graso, sino el posterior endurecimiento de la arteria. (Kritchevsky 1962)



A: placa dentro del lumen de la arteria. B: sopa grumosa o porridge

Figura 17: Representación grafica de la placa vs. “porridge”

Aun cuando ésta es una enfermedad que se conoce desde la antigüedad, su patogénesis no se encuentra totalmente dilucidada. Una de las primeras hipótesis propuestas fue la de Ross y col en 1976, quienes postularon que se desarrollaba como respuesta a factores liberados por las plaquetas adheridas a sitios endoteliales descubiertos (denudated) por la hipercolesterolemia (Ross 1976a; Ross 1976b).

En los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de la fisiopatogenia de la aterosclerosis, siendo una de las hipótesis más aceptadas la que la considera como una respuesta inflamatoria de la pared endotelial a diferentes formas de injuria, lo cual conlleva a lesiones focales o placas que en fases avanzadas pueden ocluir la luz de los vasos. (Martínez-González 2001)

2.2.1. Epidemiología y Etiología

La enfermedad cardiovascular (ECV) es una enfermedad multifactorial que involucra factores tanto genéticos como ambientales.

El reporte de la Situación de Salud en Colombia Indicadores Básicos para el 2008, el cual reporta los datos nacionales a 2006, muestra que la primera causa de mortalidad de la población Colombiana en el grupo de edad de 45 a 64 años es la enfermedad isquémica, siendo así que entre las mujeres representó el 13.1% del total de las muertes (1958 muertes con una tasa de 52.8 por cada 100000 habitantes) y en los hombres el 16.3% (3577 muertes con una tasa de 105 por cada 100000 habitantes). En el grupo de mayores de 65 se mantiene la misma tendencia con 10647 muertes entre los hombres (20.6% y una tasa de 859.6 por cada 100000 habitantes) y 9622 muertes entre las mujeres (18.9% y una tasa de 648.8 por cada 100000 habitantes) (Ministerio Protección Social, pagina web).

A nivel mundial, la ECV es la principal causa de muerte, en mujeres y hombres no solo en Estados Unidos (EU), sino también en Europa y Japón. En el 2007, una cuarta parte del total de las muertes en EU (616.000) fueron causadas por la ECV. Al hacer ajuste por edad, se observa que en el grupo de 45 a 64 años ocurrieron 471.796 muertes, y que el 22% de éstas fueron causadas por la ECV; mientras que en el grupo de mayores de 65 años, ocurrieron 1'755.567 muertes y la ECV causo el 28% de ellas (CDC, página web).

En términos generales se puede decir que existen dos escuelas para clasificar los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de las ECV.

- (1) Escuela clásica, en la cual se subdividen los factores reconocidos desde hace más de diez años en modificables y no modificables. Dentro de los factores modificables se encuentran, dieta, sedentarismo, dislipidemia, hipertensión arterial, obesidad y tabaquismo; mientras que dentro de los no modificables se relacionan edad, género, raza y herencia.
- (2) Escuela moderna, en la cual se toman en cuenta no solo los factores clásicos, sino que adicionalmente se incluyen algunos que se han descrito en los últimos años y se consideran emergentes. (Tablas 2 y 3)

Tabla 2: Factores de riesgo clásicos de la enfermedad cardiovascular

FACTORES DE RIESGO CLASICOS	RELEVANCIA EN ECV
Nivel socioeconómico bajo	Relacionado con otros factores (sedentarismo y dieta)
Sedentarismo	Disminución de HDLc, resistencia a la insulina e hipertensión
Dislipidemia	Colesterol elevado: aumenta fagocitosis por parte del macrófago
	LDLc elevado: aumento de depósitos en paredes arteriales por fagocitosis
	HDLc bajo: limitado transporte reverso del colesterol
	Triglicéridos elevados: relación inversa con concentraciones séricas de HDLc
Hipertensión	Induce activación endotelial y contribuye a inestabilidad de la placa
Diabetes Mellitus	Alteración de la vasculatura y modificaciones de algunas proteínas por glicosilación
Obesidad	Hipertensión, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, tendencia a trombosis
Tabaquismo	Aumento del estrés Oxidativo y activación endotelial
Edad	Aumento del riesgo a medida que aumenta la edad
Genero	Efecto protector de los estrógenos
Raza	Comunidad Indígena y afrocaribeña presentan predisposición genética a hipertensión y resistencia a la insulina

Adaptado de Stanner, 2005

Tabla 3: Factores de riesgo emergentes de la enfermedad cardiovascular

FACTORES DE RIESGO EMERGENTES	RELEVANCIA EN ECV
Factores lipídicos: Lipoproteína a (Lp(a))	Posible efecto trombótico y activación endotelial
Factores derivados del tejido adiposo	Leptina: aumento de presión arterial, estrés oxidativo y acumulación de lípidos en macrófagos.
	Adiponectina: regulación negativa de citoquinas pro-inflamatorias y disminución de expresión de las moléculas de adhesión en células endoteliales
Disfunción endotelial	Aumento de tráfico de monocitos y LDLc
Estrés oxidativo	Oxidación de LDLc
Homocisteína sanguínea	Posible disrupción endotelial, producción de radicales libres y aumento de trombosis
Síndrome metabólico	Hipertensión y dislipidemia

Adaptado de Fernandez-Mora, 2007

Sin importar cuál de las dos escuelas se utilice para clasificar los factores de riesgo, uno de los que se ha reportado tiene mayor influencia en el desarrollo de la ECV es la dislipidemia, ya que predispone la formación de placas en el espacio abluminal de los vasos arteriales y con la progresión de la enfermedad se va disminuyendo la luz del vaso y como consecuencia de lo anterior, se produce una disminución del riego sanguíneo, lo que conlleva a un aporte de oxígeno inferior al requerido dando como resultado isquemia, lesión e infarto de miocardio. Sin embargo, es importante aclarar que aun cuando los niveles elevados de colesterol plasmáticos son necesarios para la formación del ateroma, solo su presencia no es causa de su formación.

2.2.2 Morfología de las arterias:

Los vasos sanguíneos forman un sistema cerrado de tubos que llevan la sangre desde el corazón hasta los tejidos del cuerpo y después la devuelven al corazón. Las arterias son los vasos que llevan la sangre desde el corazón a los tejidos. Las grandes **arterias elásticas o de conducción** son las que salen del corazón y posteriormente se convierten en arterias musculares de mediano calibre que se ramifican por las distintas regiones del cuerpo. Las arterias de mediano calibre se dividen en pequeñas arterias, que a su vez, se subdividen en las llamadas **arteriolas**. Cuando las arteriolas penetran los tejidos se ramifican en incontables vasos microscópicos llamados **capilares**.

Una vez irrigados los tejidos y antes de abandonarlos, se reúnen pequeños grupos de capilares y forman las **vénulas**. Estas, a su vez, siguen confluyendo para formar progresivamente vasos de mayor calibre llamadas **venas** que conducen la sangre nuevamente al corazón. (Figura 18)

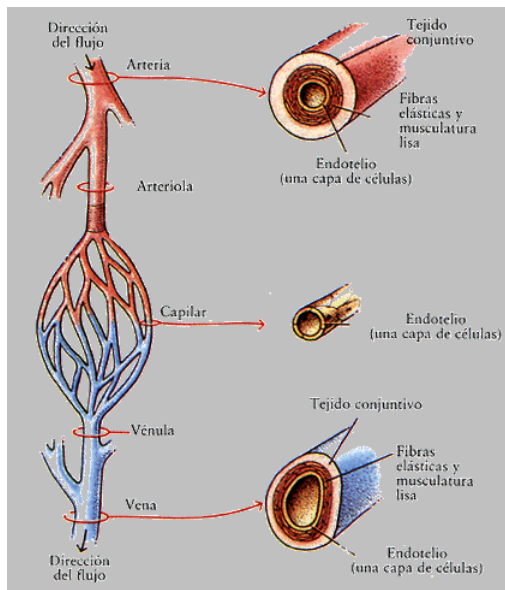


Figura 18: Esquema del sistema circulatorio

Tomado de: http://www.uc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMIval7.1.html

Las arterias, están compuestas por tres capas ó tunicas: (1) la interna ó **túnica íntima**, está formada por el endotelio (epitelio plano simple) que se encuentra en contacto con la sangre, una membrana basal y una capa de tejido elástico llamado lámina elástica interna; (2) La capa medio o **túnica media** suele ser más gruesa. Está formada por fibras elásticas y células del músculo liso vascular (CML); y (3) La capa externa o **adventicia (túnica externa)** está formada principalmente por fibras elásticas y colágenas. (Figura 19)

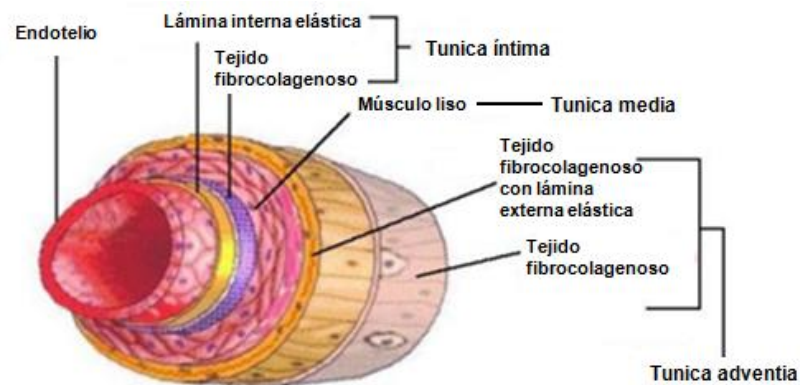


Figura 19: Morfología de la arteria

Adaptado de: <http://greenfield.fortunecity.com/rattler/46/arteries.htm>

Las células endoteliales recubren el interior de todo el tejido vascular. En los adultos consta de aproximadamente diez trillones (10^{13}) de células que forman un “órgano” de casi 1 kg de peso total. Aun cuando en el pasado, el endotelio fue descrito como inerte, actualmente se reconoce que tiene diversas funciones como, por ejemplo, la de formar una superficie no-trombótica, no-adherente y que actúa como una barrera que previene el paso de moléculas grandes al subendotelio, entre otras.

Las células musculares lisas (CML) de la túnica media se contraen y relajan para alterar el diámetro luminal del vaso en respuesta a una variedad de estímulos circulantes y locales, regulando el tono vascular y la presión arterial.

2.2.3. El endotelio:

El endotelio vascular es un tejido complejo y dinámico que hace parte relevante de la pared vascular. Es un tejido especializado que actúa como una lámina de transición entre la circulación sanguínea y la íntima vascular. Su masa total equivale a la masa de cinco corazones y su área aproximada es de 1500 m^2 .

Se encuentra distribuido por todo el sistema cardiovascular, desde las cavidades cardíacas hasta los capilares y recubre los cuerpos cavernosos y los vasos linfáticos. El endotelio es un órgano multifuncional que responde a estímulos nerviosos, metabólicos, inmunológicos y mecánicos, razón por la cual ha llegado a considerarse una prolongación del sistema neuroendocrino. La gran capacidad de adaptación y disposición de las células endoteliales a las necesidades tisulares, revelan la importancia de esta capa en el funcionamiento de los tejidos, al regular el flujo sanguíneo y los nutrientes por ellos requeridos.

El funcionamiento endotelial depende de la integridad de sus células, de la apropiada conexión establecida entre ellas y de la adecuada producción de sustancias vasoactivas. Cada uno de estos elementos le permiten jugar un papel importante en procesos fisiológicos (regulación del tono vascular, interacción con los leucocitos, coagulación, fibrinólisis, agregación plaquetaria, angiogénesis etc.) y patológicos (diabetes, aterosclerosis, trombosis, isquemia coronaria, etc.).

El endotelio cumple sus funciones constitutivas a través de la síntesis y liberación de sustancias paracrinas y autocrinas entre las que se destacan las prostaciclina, el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y las endotelinas.

Las funciones constitutivas del endotelio pueden resumirse así:

(1) Permeabilidad: actuar como una barrera para prevenir el paso de moléculas de gran tamaño al sub-endotelio.

(2) Trombogenicidad: La agregación plaquetaria es inhibida por la secreción endotelial de PGI_2 y del factor relajador derivado del endotelio-NO (EDRF-NO), ahora conocido como óxido nítrico (NO)

(3) Tono vasomotor: vasodilatación promovida por la secreción de PGI_2 y EDRF-NO.

(4) Migración y proliferación de células musculares lisas (CML): inhibida por la secreción de heparan sulfato y EDRF-NO. (Figura 20)

(5) Expresión de proteínas de membrana que actúan como moléculas de adhesión para receptores específicos de monocitos y linfocitos T. Estas moléculas pueden ser selectinas como la E- y P- ó pertenecer a la súper familia de las inmunoglobulinas como VCAM-1 y las moléculas 1, 2 y 3 de adhesión intercelular (ICAM-1, 2, 3).

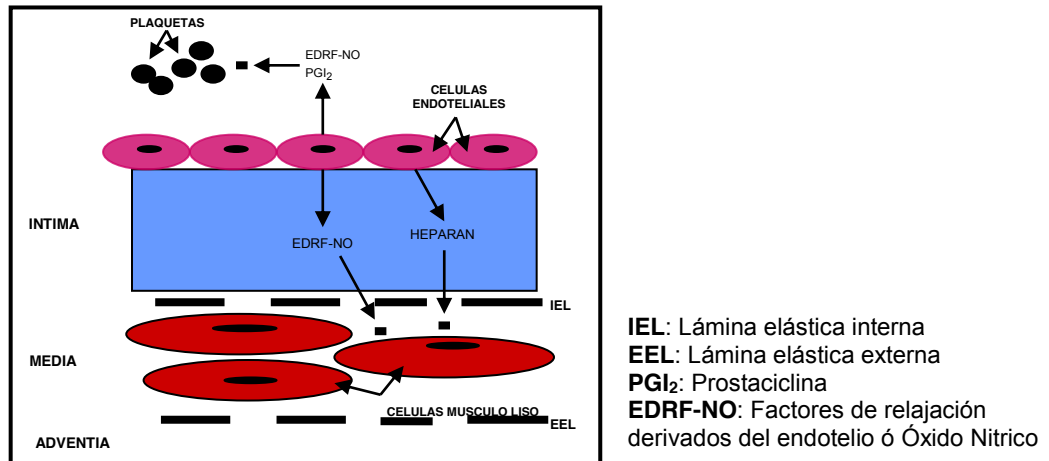


Figura 20: Diagrama de una arteria muscular normal
 Tomado de: Consigny 1995

Cualquier modificación de una o más de estas propiedades puede representar una manifestación de disfunción endotelial, entendida ésta como “cualquier alteración de la fisiología del endotelio que produzca una descompensación de dichas funciones” (Ross 1993).

Finalmente, es importante resaltar que el endotelio también produce otras sustancias bajo circunstancias de lesión como por ejemplo los factores de crecimiento: factor de crecimiento del fibroblasto, factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF), factor de crecimiento semejante a la insulina.

2.2.4. Formación de la placa ateromatosa:

En términos generales, el proceso aterogénico inicia con el depósito de lípidos provenientes de las lipoproteínas plasmáticas en la pared vascular, especialmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales son oxidadas por radicales libres en el espacio subendotelial produciendo inicialmente LDL mínimamente oxidadas (LDLmox) (Witzum 1991).

Es importante tener en cuenta que existen dos tipos de LDLs, las llamadas normales (nativas) y las LDL pequeñas. Estas últimas tienen una mayor capacidad aterogénica debido a que por su menor contenido lipídico presentan una distribución espacial diferente de las LDL normales, hecho que impide su normal reconocimiento por los receptores permaneciendo más tiempo en circulación y aumentando su probabilidad de ingresar al espacio subendotelial donde la oxidación se ve favorecida por su menor contenido de compuestos con actividad antioxidante ser oxidadas; además, por su menor tamaño, se

propicia una mayor aproximación en las cargas positivas de los aminoácidos arginina y lisina de la cadena peptídica de la apolipoproteína B (Apo B) aumentando así la afinidad por los proteoglicanos de la pared vascular (Chait 1993; Berneis 2002).

Una vez en la íntima, las LDL que poseen gran afinidad por los glicosaminoglicanos se unen a estos aumentando su tiempo de retención y por ende, la probabilidad de ser modificadas, ya sea por procesos como el de oxidación mediante enzimas mieloperoxidasas y lipooxigenasas ó por interacción con proteínas de la matriz extracelular (MEC) (Figura 21).

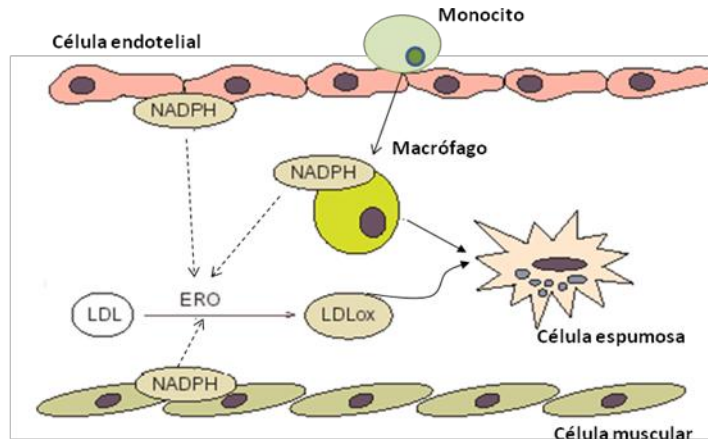


Figura 21: Diagrama del proceso de oxidación de las LDL

Adaptado de: <http://www.dfarmacia.com/ficheros/images/4/4v22n11/grande/4v22n11-13055925tab03.gif>

La modificación de las LDL (LDLmox ó LDLox) cumple un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis debido a que intervienen prácticamente en todas las etapas de la formación de placa: (1) son quimiotractantes que en unión con otras moléculas como, por ejemplo, la proteína quimiotractante de los monocitos, secretada por el endotelio disfuncionante, reclutan monocitos circulantes al subendotelio para ser convertidos en macrófago; (2) dañan directamente el endotelio y estimulan el incremento de la adhesión y subsiguiente migración de los monocitos y linfocitos T al espacio subendotelial; (3) inducen la expresión en células endoteliales de la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), de moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) y de P-selectina, lo que facilita la unión de los monocitos circulantes al endotelio; (4) provocan apoptosis de las células endoteliales y altera la producción de NO y de radicales libres; (5) inhiben la salida de macrófagos de la lesión a órganos linfoides secundarios; (6) permiten que el macrófago pueda captar grandes cantidades de lípidos debido a que esta captación se realiza vía receptores *scavenger* que no son saturables.

Adicionalmente a la retención y oxidación de las LDL se debe presentar de forma simultánea el mecanismo llamado “activación del endotelio” para permitir la adhesión de los monocitos. Existen diferentes hipótesis de cómo ocurre este mecanismo: Kune y col en 1992, postularon que la lisofosfatidilcolina formada durante el proceso de oxidación produce dicha activación (Kune 1992; Luscher 1995). Posteriormente, Colomé y col en el

2000, postularon que las LDLmox son las responsables de iniciar este proceso debido a que poseen mayor capacidad que las LDL nativas de inducir dicha adhesión. Recientemente se ha clonado un receptor de superficie para las LDL denominado “lectin-like Oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)” capaz de unir las LDLox y que, por ende, juega un papel muy importante en este proceso de activación endotelial (Kume 1998; Li 2000).

En la adhesión de los monocitos al endotelio se ha propuesto un modelo en el que primero existe una interacción lábil entre el monocito y el endotelio por medio de las selectinas. Posteriormente, el endotelio activado sobre expresaría VCAM-1 e ICAM-1 que permitiría una unión más estable de los monocitos a través de receptores específicos.

Las células endoteliales activadas expresan una variedad de citoquinas que tienen distintas acciones sobre los monocitos circulantes, así el aumento en la expresión de moléculas de adhesión tales como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) favorece la fijación de los monocitos, atraídos por la secreción de la proteína-1 quimiotáctica de los monocitos (MCP-1). Una vez dentro del espacio subendotelial, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) estimula la proliferación de los monocitos y su diferenciación en macrófagos (Libby 1993; Jang 1994; Kamanna 1999).

El endotelio activado también tiene acción sobre los linfocitos T, permitiendo su fijación a la pared vascular mediante las moléculas de adhesión ICAM-1 y Selectina E y su posterior penetración a la íntima por la secreción de factores quimiotácticos. Los linfocitos T en el ambiente subendotelial producen citoquinas tales como M-CSF, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y, fundamentalmente, interferón gamma (IFN- γ) que desempeñan importantes funciones en el proceso de formación de la placa aterogénica (Hansson 2001) (Figura 22).

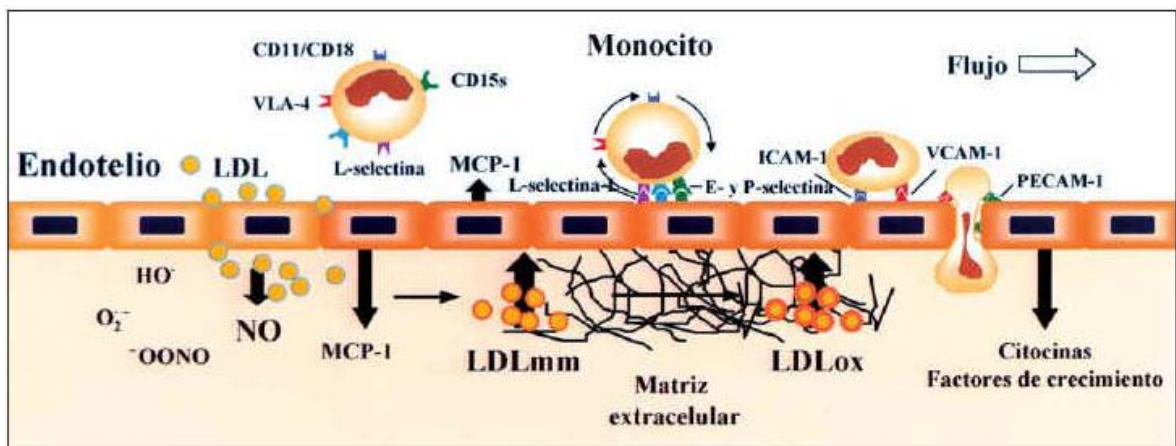


Figura 22: Adhesión de monocitos al endotelio mediante moléculas de adhesión
Tomado de: Badimón 2002

Producida la activación endotelial, las plaquetas se fijan a las células endoteliales segregando distintas citoquinas entre las que se destaca el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que juega un papel importante en la proliferación y migración de las células musculares lisas hacia la íntima (Martínez-Gonzalez 2001). La activación del endotelio vascular produce, además, una serie de cambios funcionales a

nivel del vaso: se pierde la regulación del tono vascular mediado por relajantes como el óxido nítrico (NO), se incrementa el efecto constrictor de la endotelina-1, se inicia la coagulación por la vía extrínseca por la expresión de un factor tisular, y se frena la fibrinólisis por un aumento en la producción del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Schneider 1997).

Adicionalmente, la reducción en los niveles de heparano más la disminución en la liberación de PGI₂ y EDRF-NO permite que las células musculares lisas de la túnica media se transformen de tipo contráctil a no contráctil. Las células del músculo liso ya transformadas pueden liberar enzimas que degradan la matriz extracelular circundante permitiéndoles migrar hacia la túnica intima en donde proliferan. Esta migración ocurre “bajo la dirección” del PDGF, sustancia quimioatractante liberada por plaquetas, células endoteliales, macrófagos y células del músculo liso. El PDGF en unión con otros mitógenos como, por ejemplo, el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF, por su nombre en inglés, Insulin like growth factor) y factores de crecimiento de fibroblastos estimulan algunas de estas células del músculo liso para que entren en mitosis.

Otro de los pasos claves en la formación de la placa es la captación de las LDLox por los macrófagos. Los macrófagos en el ambiente subendotelial captan LDLox y se convierten en “células espumosas”. Esta captación no es mediada por receptores debido a que, una vez las LDL inician sus modificaciones pierden su capacidad para unirse a los receptores. Por el contrario, los macrófagos las captan mediante receptores scavenger principalmente los de tipo I y II de la clase A, cuyo número aumenta por acción del M-CSF (Freeman 1994). A diferencia de lo que ocurre con los receptores B:E su síntesis no depende del nivel de colesterol presente dentro de la célula, de manera que el macrófago incorpora grandes cantidades de lípidos formando inclusiones citoplasmáticas que le dan un aspecto espumoso (células espumosas). Cuando estas células mueren su alto contenido de lípidos pasa a formar el núcleo o core lipídico del ateroma (Ball y col 1995) (Figura 23).

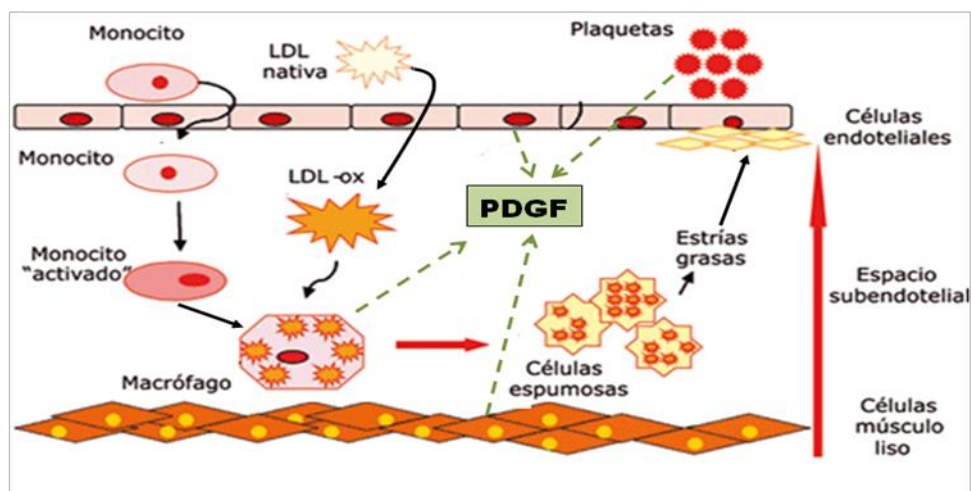


Figura 23: Diagrama del reclutamiento de las células del músculo liso para la formación de placa ateromatosa

Adaptado de: Delgado-Roche, 2009

Los macrófagos presentes en la lesión ateromatosa segregan una variedad de enzimas hidrolíticas (colagenasas, gelatinasas, elastasas, etc.) que remodelan la matriz extracelular. Al producirse la degradación del proteoglicano heparan sulfato de dicha matriz, las células musculares lisas inician la diferenciación hacia un estado activado caracterizado por la síntesis elevada de colágeno tipo 1, elastina y proteoglicanos que se acumulan en la matriz durante el desarrollo de la placa; también expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, citoquinas y factores de crecimiento; y presentan receptores scavenger en su membrana en respuesta al TNF- α e IFN- γ producidos por los macrófagos y los linfocitos T, transformándose en células espumosas (Campbell 1994).

Durante el proceso ateromatoso, las células del músculo liso de la capa fibrótica son embebidas en tejido conectivo. Normalmente, debajo de la capa fibrótica se encuentran localizadas células espumosas y células del músculo liso, pero cuando la lesión está más avanzada, se observa que la capa más profunda se necrotiza, posiblemente debido al depósito de tejidos lipídicos tóxicos, radicales libres y/o isquemia atribuida al incremento de la distancia para la difusión entre el tejido y la sangre. Así mismo, se observa la presencia de depósitos de hidroxapatita de calcio que son atribuidos posiblemente a la cristalización de calcio, a cristales de colesterol pre-existentes ó a la actividad osteogénica de las células de la lesión (Figura 24).

La proliferación de las células musculares lisas y su migración desde la capa media arterial a la íntima está regulada por un complejo sistema de citoquinas producidas por otros tipos celulares (regulación paracrina), por citoquinas producidas por las mismas células musculares (regulación autocrina) y por la presencia de las LDLox. En la regulación paracrina participan los macrófagos a través de las secreciones de interleuquina-1 (IL-1) que interviene en la activación celular, de factor de crecimiento fibroblástico (FGF) que induce la síntesis proteica y la división celular, y de PDGF y el factor de crecimiento epidérmico (EPG) que estimulan la proliferación y migración celular; los linfocitos T, por su parte, inducen la expresión de receptores para PDGF en las células musculares lisas mediante la acción del IFN- γ y estimulan a los macrófagos a producir IL-1 y PDGF; y las plaquetas, por su parte, intervienen como importantes productores de PDGF. En la regulación autocrina, las células musculares lisas producen FGF, IL-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor transformador del crecimiento tipo alfa (TGF-alfa), FGF y TNF-alfa, como citoquinas que activan la proliferación y migración de las células hacia la íntima vascular (Reidy 1993; Stein 1995). La placa ateromatosa aumenta de tamaño a medida que ocurren estos eventos, llegando a provocar la estenosis vascular. Su estabilidad depende del aumento en la actividad de las enzimas hidrolíticas producidas por los macrófagos que van degradando la matriz celular y de la inhibición en la producción de colágeno por parte de las células musculares lisas inducida por IFN- γ o de la inducción de su muerte celular por apoptosis, ya que estos acontecimientos pueden debilitar la capa fibrosa del ateroma, haciéndola más frágil y propensa a una ruptura, de manera que cualquier fuerza mecánica puede fragmentarla con la consiguiente formación de un trombo (Libby 1996).

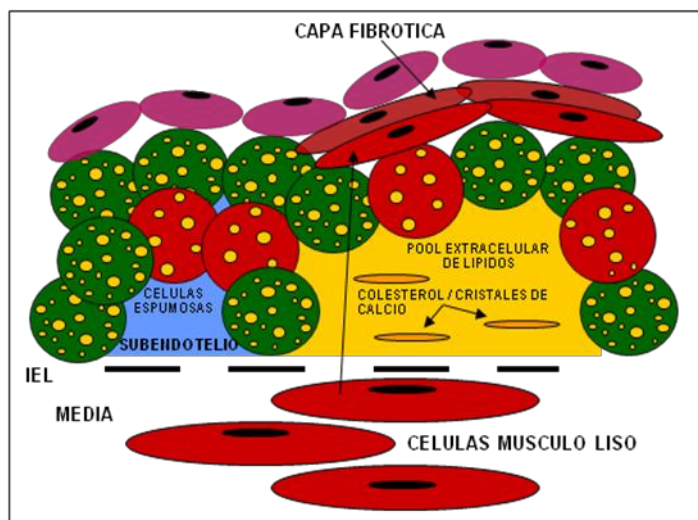


Figura 24: Diagrama de la formación de la capa fibrótica de la lesión aterosclerótica
Tomado de: Consigny 1995

El paso final en el desarrollo de la lesión aterosclerótica es la conversión de la lesión fibrótica en “avanzada”, lo que significa que se ha formado un trombo como resultado de ulceración de la placa o de hemorragia (Figura 25). El rompimiento de la placa ocurre con mayor frecuencia en donde la capa fibrosa es más delgada y por ende más débil. Falk en 1992 describió que la vulnerabilidad de la placa a ruptura depende de: (1) tamaño y consistencia del “core” o núcleo del ateroma; (2) grosor y contenido de colágeno de la capa fibrosa que cubre el core; (3) presencia de inflamación en la capa y (4) “fatiga” de la capa.

Así mismo, Consigny en 1995 recalcó que los factores responsables por la ruptura de la placa incluyen estrés por rozamiento, hemorragia por ruptura de una rama del vaso *vasorum*, aumento de estrés en el lumen arterial debido al depósito de lípidos y la liberación por parte de los macrófagos de enzimas que degradan la matriz.

Posterior a la ruptura de la placa ocurre la formación del trombo (trombosis), la cual involucra la adhesión y agregación plaquetaria y la activación de la cascada de coagulación. La cascada se inicia por la exposición de sangre al colágeno dentro de la placa y por factores tisulares (tromboplastina tisular) producidos por las células endoteliales y los macrófagos de la lesión fibrótica. El factor tisular estimula la vía extrínseca de coagulación en la cual mediante la activación del factor VII se activa el factor X el cual posteriormente cataliza la conversión de protrombina a trombina. La trombina cataliza la conversión de fibrinogeno a fibrina, la cual posteriormente sufre polimerización para estabilizar el trombo. La trombina también estimula la proliferación celular dentro de la lesión fracturada mediante la promoción de la adhesión plaquetaria y la liberación de PDGF.

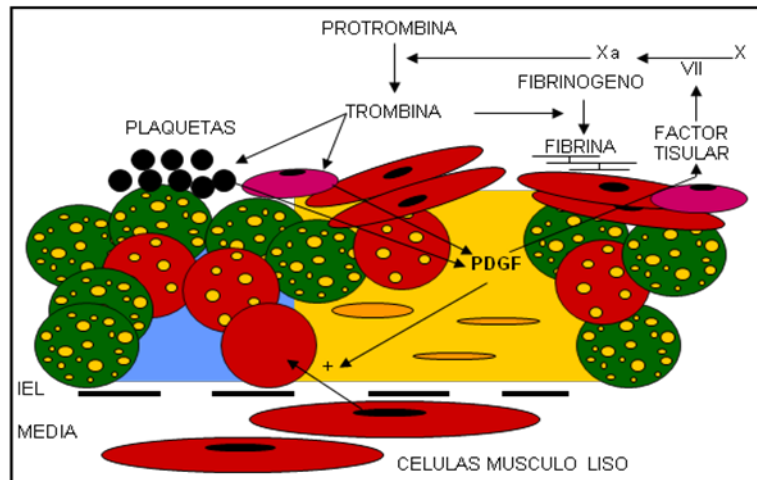


Figura 25: Diagrama de la lesión aterosclerótica complicada y el proceso que contribuye a su formación
 Tomado de: Consigny 1995

Dependiendo del balance entre el proceso trombótico y el trombolítico, el trombo puede tomar dos vías diferentes: (1) se puede disolver sin producir secuelas clínicas, o (2) se puede incorporar a la lesión aterosclerótica produciendo aumento del tamaño de la lesión y secuelas clínicas cuando la estenosis resultante es tan grande que limita la circulación a través de la arteria. La ruptura de la placa también causa consecuencias clínicas si el trombo que se forma es lo suficientemente grande para ocluir la arteria o si es liberado y viaja hacia un vaso distal ocluyéndolo.

La Figura 26 presenta un resumen de los mecanismos celulares y moleculares que dan origen a la formación de placa aterosclerótica explicados en detalle anteriormente.

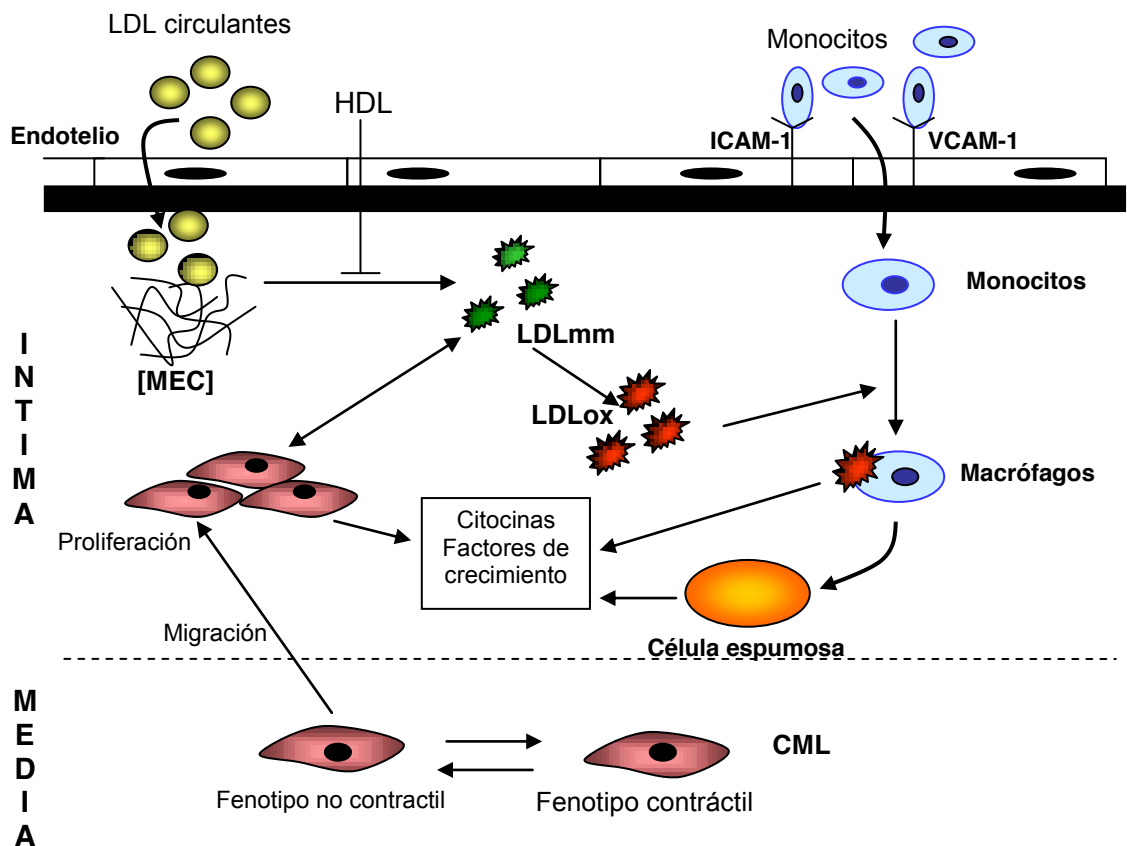


Figura 26: Esquema de los mecanismos celulares y moleculares que dan origen a la formación de placa aterosclerótica
Adaptado de: *Martínez-González, 2001*

2.3. Tocotrienoles y Enfermedad Cardiovascular

El estudio de esta relación se inicia en la década de los 80's cuando Qureshi demostró que el efecto hipocolesterolemico de la cebada ocurría a nivel de la síntesis endógena de colesterol (Qureshi 1986). Posteriormente, los estudios de Goldstein en 1990 y Correll en 1994, permitieron dilucidar el mecanismo por medio del cual el compuesto de la cebada (tocotrienol) cumplía este papel. La cadena lateral prenilada de los T3E induce la enzima prenil-fosfato-fosfatasa encargada de catalizar la defosforilación del farnesilo, producto derivado del mevalonato, produciendo un incremento celular del farnesol, el cual a su vez regula mediante un proceso post-transcripcional la actividad de la enzima hidroximetil glutaril CoA reductasa (HMG CoA reductasa) (Figura 27), efecto contrario al causado por el α -TF que induce la actividad de esta enzima (Qureshi 2002, Khor 2002). Posteriormente, Pearce et al en 1994 adjudicaron este efecto a la cadena lateral del

farnesilo y a la sustitución metil/hidroxi del γ -T3E que ha demostrado el efecto más potente.

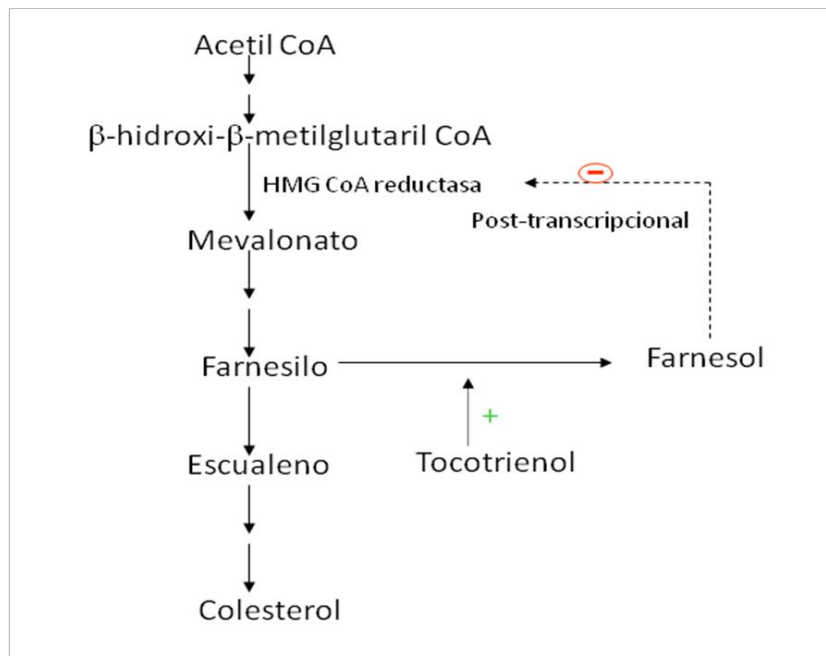


Figura 27: Mecanismo regulatorio del tocotrienol sobre síntesis de colesterol
Tomado de: Theriault, 1999.

En los siguientes años, la investigación se centró en estudios en animales e *in vitro*. Qureshi et al., reportaron en 1991a que al alimentar cerdos hipercolesterolemicos con dietas ricas en T3E obtuvieron una disminución de 44% en el colesterol total y 66% en la LDL, así como, también, en los niveles plasmáticos de apolipoproteína B (apoB; 26%), de tromboxano B2 (41%) y del factor plaquetario 4 (29%); esta última observación sugiere que tienen un efecto antitrombótico y por ende protector del endotelio. Pearce en 1992, utilizando células aisladas de hígado, demostró que el α -T3E inhibió la síntesis del colesterol en un 32%. Sin embargo, también observó que los isómeros γ y δ poseían mayor poder hipocolesterolémico.

Los anteriores resultados dieron sustento a posteriores estudios en humanos para tratar de comprobar este efecto. Qureshi y col en 1991b, en un estudio crossover doble ciego con una duración de 8 semanas, compararon el efecto de suministrar cápsulas de aceite de palma con fracción rica en tocotrienoles (FRT) llamadas *Palmvitee* (200 mg fracción capsula/día), con 300 mg de aceite de salvado de arroz, sobre el perfil lipídico de sujetos hipercolesterolemicos. Las cápsulas FRT contenían una mezcla de α -tocoferol y α -, γ - y δ -T3E, mientras que las de salvado de arroz contenían adicionalmente didesmetil-T3E. Los sujetos que recibieron las cápsulas de FRT después de una dieta controlada mostraron una reducción en el colesterol plasmático de 15 – 20%, siendo la mayor reducción en la fracción LDL, mientras que en la fracción HDL no se observó cambio. Así mismo, se produjo una reducción de apoB en plasma (10 - 15%), tromboxano (25%), factor plaquetario 4 (16%) y glucosa (12%). Por el contrario, el grupo placebo que recibió capsulas de aceite de maíz no presento variación en los parámetros estudiados.

Simultáneamente, Tan y col conducían un estudio independiente del de Qureshi, en el cual los voluntarios tomaron una capsula de *Palmvitee* durante 30 días consecutivos. Cada capsula contenía 18, 42 y 240 mg de tocoferoles, tocotrienoles, y oleína de palma, respectivamente. Los resultados del estudio mostraron una reducción en el colesterol total entre 5-35.9% y de LDLc entre 0.9-37% comparados con sus valores basales (Tan 1991)

Estos dos estudios realizados en 1991 por grupos independientes mostraron efectos hipocolesterolemicos similares del *Palmvitee*, lo cual llamo la atención de la comunidad científica y dio pie para estudios posteriores.

Qureshi y col en 1995 estudiaron el efecto de *Palmvitee* y γ -T3E en sujetos hipercolesterolemicos luego de una adaptación de 4 u 8 semanas a la dieta paso 1 de la Asociación Americana del Corazón (AHA, por su sigla en inglés). Como resultados obtuvieron que el solo hecho de realizar la dieta paso 1 por 4 semanas causó una reducción en el colesterol plasmático del 5%, el cual disminuyó un 2% adicional en el grupo que siguió el periodo de adaptación durante 8 semanas. Sin embargo, esta disminución en colesterol fue potenciada al introducir durante 4 semanas al tratamiento las capsulas de *Palmvitee* ó los 200 mg de γ -T3E. El grupo que luego de una adaptación de 4 semanas incluyo *Palmvitee*, redujo adicionalmente un 10% sus niveles de colesterol plasmático y el grupo que luego de 8 semanas de adaptación incluyo γ -T3E redujo los niveles en un 13%. Ninguno de los dos tratamientos mostró impacto sobre los niveles de HDLc (Qureshi 1995).

Por otro lado, Tomeo et al., en 1995, demostraron que suplementos de T3E reducían los niveles de peróxidos de lípidos en la sangre, causando una aparente mejoría en el flujo sanguíneo en pacientes con aterosclerosis de la arteria carótida.

Therriault y col. demostraron en 1999 que el T3E podía reducir los niveles de apoB (indicador de riesgo aterogénico) en el plasma en un 24% aun cuando su síntesis se aumentaba en un 60%, lo cual los llevó a postular, que los T3E al producir una disminución en la disponibilidad de colesterol, previenen la interacción colesterol-apoB naciente y por lo tanto inhibirían la síntesis y translocación de la apoB a través del retículo endoplasmático (RE), lo que se traduciría en un aumento en su degradación intracelular y la inhabilidad para sintetizar VLDLc. Adicionalmente, Parker y col en 1993 ya habían postulado que los T3E ejercían una regulación positiva sobre los receptores hepáticos de LDL favoreciendo su depuración del plasma (Figura 28). Black y col, en 2000, mostraron en ratones apoE +/- que desarrollan ateromas cuando se les da una dieta alta en grasa y colesterol, que los T3E inhibían el aumento en colesterol plasmático, la formación de ateromas y el colesterol hepático. Así mismo, los autores señalan que el efecto no se le puede adscribir a su capacidad como antioxidantes. Posteriormente, Raederstorff y col. en 2002, demostraron en hamsters que el γ -T3E es mucho más efectivo que una mezcla de T3E en la reducción del Colesterol plasmático puesto que éste rebajó los niveles entre 7 y 23% con tan sólo 2 semanas de tratamiento. Finalmente, Therriault y col. en 2002, demostraron que los T3E reducen la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio.

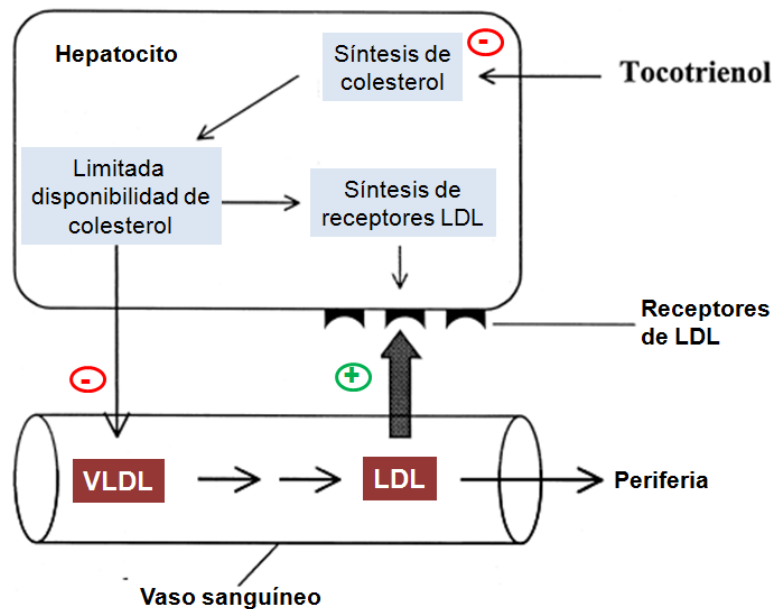


Figura 28: Mecanismo propuesto para la regulación de síntesis de LDL por los tocotrienoles

Adaptado de: Theriault, 1999

Existen otros factores que han sido implicados en el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Entre ellos, diversos estudios epidemiológicos han validado la hipótesis de que niveles reducidos de Lp(a), una proteína de superficie que se encuentra en algunas lipoproteínas, están asociados con la reducción de la aterogénesis y trombosis (Theriault 2000), pero igualmente se ha descrito que no es fácil reducir con manipulaciones dietéticas la concentración de Lp(a) debido a que su expresión está genéticamente determinada. Sin embargo, es de anotar que Qureshi demostró en 1997 que la FRT de aceite de salvado de arroz enriquecida con didesmetil-T3E, sin grupos metilo en el anillo cromanol, redujo los niveles de Lp (a) en plasma en un 17%.

Adicionalmente, se han realizado estudios en los cuales los T3E se han utilizado como coadyuvantes al tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia. Qureshi y col en el 2001b llevaron a cabo un estudio (dividido en 5 fases de 35 días cada una), en el cual querían determinar el efecto del consumo de una preparación FRT a base de salvado de arroz por si sola y en combinación con el tratamiento farmacológico utilizando lovastatina. Las fases utilizadas fueron: (I) patrón de dieta usual de los sujetos, (II) dieta paso uno de la AHA, (III a V) Todos los sujetos siguieron la dieta paso 1, pero adicionalmente se dividieron en dos grupos; los sujetos del primer grupo recibieron adicional a la dieta paso 1, 10 mg lovastatina, 10 mg lovastatina + 50 mg FRT ó 10 mg lovastatina + 50 mg α -tocoferol por día, en cada una de las fases respectivamente. El segundo grupo, los sujetos fueron tratados siguiendo el mismo protocolo con la excepción que en la tercera fase recibieron 50 mg de FRT en lugar de los 10 mg de lovastatina. Los resultados demostraron que tanto los FRT como la lovastatina acompañados de la dieta paso 1

disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol (14% y 13%) y LDLc (18% y 15%), respectivamente. La combinación de FRT + lovastatina + dieta paso 1 produjo una mayor disminución en los parámetros lipídicos (20-25%), así mismo, se observó un incremento en la relación HDL: LDL de 46% en el primer grupo y 53% en el segundo grupo. (Qureshi 2001b). Resultados similares fueron observados en otro estudio con humanos en el que se utilizó la dieta paso 1 + una dosis de 100 mg de FRT/día, lo que llevó a concluir que esta combinación podría disminuir el riesgo a desarrollar enfermedad cardiovascular en sujetos hipercolesterolemicos (Qureshi 2002).

Finalmente, es importante resaltar que Los T3E al igual que los TF son capaces de terminar las cadenas de propagación de radicales libres, lo cual neutralizara los radicales peroxilo y alcoxilo generados durante la peroxidación de los lípidos por radicales libres de oxígeno. La importancia de esta función radica en que la peroxidación de los lípidos de las LDL hace que estas LDLox sean reconocidas por los receptores scavenger presentes en los macrófagos dando inicio así a la formación de placa ateromatosa (Reaven 1993). Teniendo en cuenta este postulado, en el 2001 el grupo de Nafeeza investigó el efecto de FRT sobre el desarrollo microscópico de la aterosclerosis y la peroxidación de los lípidos en aortas de conejos. Luego de 10 semanas de tratamiento observó que los conejos alimentados con FRT presentaron menor contenido de malonaldehido y engrosamiento de la intima y mejor preservación de la elasticidad de la intima que los conejos sin tratamiento, llegando a la conclusión que los T3E podrían reducir la aterosclerosis experimental. (Aggarwal 2010)

La Figura 29 muestra un esquema de los efectos regulatorios de los T3E sobre la formación de placa ateromatosa.

Los resultados de las últimas décadas de investigación sobre los T3E han aportado gran cantidad de evidencia sobre su papel hipocolesterolemico. Sin embargo, la investigación sobre los efectos de este compuesto en los últimos años se ha centrado en su papel sobre el desarrollo del cáncer y las enfermedades neurológicas. A continuación se presenta una Tabla resumen de los resultados más relevantes en T3E y ECV (Tabla 4).

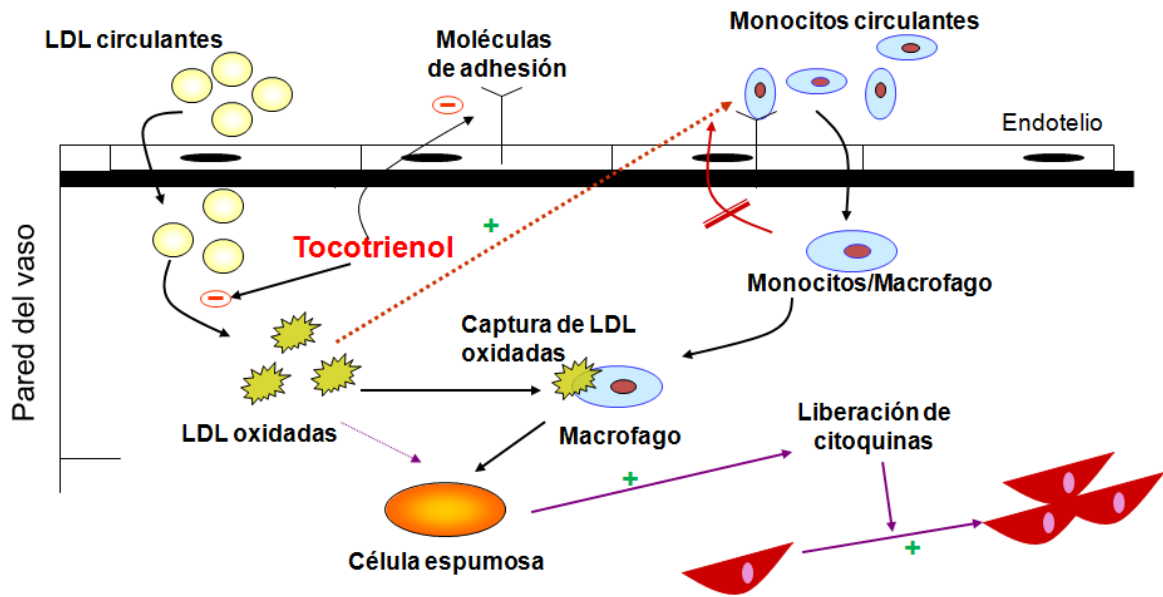


Figura 29: Proceso esquemático: Regulación por parte de los T3E de la formación de placa aterosclerótica
 Adaptada de: Theriault, 1999

Tabla 4: Resumen cronológico de resultados relevantes sobre el papel antiaterogénico de los tocotrienoles

ESTUDIOS	AÑO	RESULTADOS RELEVANTES
Qureshi y col.	1986	Los tres enlaces dobles de la cadena isoprenoide de los T3E son esenciales para la inhibición de la síntesis del colesterol. Los T3E producen una supresión post-transcripcional de la HMG-CoA reductasa
Serbinova y col.	1991	α -T3E es un antioxidante más potente que el α -TF
Qureshi y col. Tan y col.		Estudios en humanos demostraron reducción en el colesterol plasmático, LDL, apoB, tromboxano, factor plaquetario 4 y glucosa. No se observó cambio en la fracción HDL.
Qureshi y col		Estudio en cerdos con hiperlipidemia genética demuestró reducción en los niveles plasmáticos de colesterol, apoB, tromboxano B2 y factor plaquetario.
Pearce y col.	1992	El efecto del γ -T3E sobre la biosíntesis del colesterol es 30 veces más potente que la del α -T3E.
Parker y col.	1993	La incubación de diferentes tipos de células con γ -T3E inhibe la tasa de incorporación en la vía del colesterol del [14C] acetato pero no del [3H] mevalonato.

Suzuki y col.	1993	In vitro: el T3E es mejor antioxidante que el TF por encontrarse localizado más cerca de la superficie en la membrana celular.
Pearce y col	1994	HepG2: La cadena lateral del farnesilo y la sustitución metil/hidroxi del γ -T3E son los responsables de la regulación de la HMG-CoA reductasa
Qureshi y col	1995	Disminución de colesterol plasmático en sujetos hipercolesterolémicos.
Tomeo y col.	1995	Reduce los niveles de peróxidos de lípidos en la sangre, causando una aparente mejoría en el flujo sanguíneo en pacientes con aterosclerosis carótida
Qureshi y col	1997	FRT de aceite de salvado de arroz enriquecida con didesmetil-T3E, sin grupos metilo en el anillo cromanol, redujo los niveles de Lp (a) en plasma
Therriault y col	1999	T3E no solo produce disminución en la disponibilidad de colesterol, sino que adicionalmente estimula la degradación de apoB posiblemente como resultado de su poca translocación al retículo endoplasmático.
Black y col.	2000	T3E inhibe el aumento en colesterol plasmático y la formación de ateromas en ratones apoE +/-
Qureshi y col	2001	La adición de TRF al tratamiento farmacológico (lovastatina) o no farmacológico (dieta paso 1) para la hipercolesterolemia, potencia el efecto del tratamiento.
Raederstorff y col.	2002	Hamsters: γ -T3E es mucho más efectivo que una mezcla de T3E
Qureshi y col	2002	Disminución de los niveles plasmáticos de colesterol dependiente de la dosis en humanos hipercolesterolemicos tratados con TRF proveniente de salvado de arroz.
Therriault y col.	2002	Los T3E reducen la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio
Iqbal y col.	2003	Estudios <i>in vivo</i> llevaron a apoyar las observaciones <i>in vitro</i> que tanto la actividad de la HMG-CoA reductasa como de la proteína de expresión son sensibles a los T3E
Das	2005	Cardioprotección con tocotrienol: su poder antioxidante se vincula con su capacidad para estabilizar los proteasomas.
Chen y Cheng.	2006	γ -tocotrienol puede estimular el catabolismo del colesterol
Song and Debose-Boyd.	2006	γ - y δ -T3Es estimulan la ubiquitinación y degradación de la HMG-CoA reductasa.
Nakagawa y col	2007	<i>In Vivo</i> Angiogenesis es suprimida por los T3E
Das y col	2008	Cardioprotección con T3E de la palma: cada isómero tiene una capacidad diferente.
McNamara D.	2010	Aceite de palma y salud: este es un claro ejemplo de como los resultados de la ciencia se pueden utilizar para mal informar a la comunidad
Muharis y col	2010	Los T3E restauran la relajación aortica dependiente de estreptomycin en ratas diabéticas e hipertensas

Tholstrup	2011 2012	El aceite de palma incrementa moderadamente el colesterol en sujetos saludables, al compararlo con aceite de oliva.
-----------	--------------	---

3. OBEJETIVOS

3.1.1. GENERAL

Determinar el efecto de tocotrienoles de la dieta sobre el perfil lipídico y sobre la capacidad oxidativa de las LDL de conejos alimentados con dietas semisintéticas que contienen colesterol y en sujetos humanos aparentemente sanos.

3.2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar el perfil de ácidos grasos y la concentración de los diferentes isómeros de la vitamina E presentes en los ingredientes a utilizar durante los diferentes ensayos experimentales.
- Determinar el perfil de ácidos grasos y la concentración de los diferentes isómeros de la vitamina E presentes en las dietas semisintéticas preparadas para alimentar a los animales experimentales.
- Determinar el efecto del consumo de tocotrienoles dietarios sobre los niveles de colesterol total, LDLc y HDLc en sangre de los animales de experimentación alimentados con las diferentes dietas planteadas.
- Determinar el efecto que tienen los tocotrienoles dietarios sobre la susceptibilidad oxidativa de las LDL plasmáticas en los conejos de experimentación alimentados con las diferentes dietas planteadas.
- Determinar el efecto del consumo de tocotrienoles dietarios sobre los niveles de colesterol total, LDLc y HDLc en sangre de humanos alimentados con dietas altas y bajas en tocotrienoles.
- Determinar el efecto que tienen los tocotrienoles dietarios sobre la susceptibilidad oxidativa de las LDL plasmáticas de humanos alimentados con dietas altas y bajas en tocotrienoles..

4. METODOLOGIA

La presente investigación se dividió en 3 fases: caracterización del vehículo a utilizar, experimentación animal y experimentación en humanos (Figura 30).

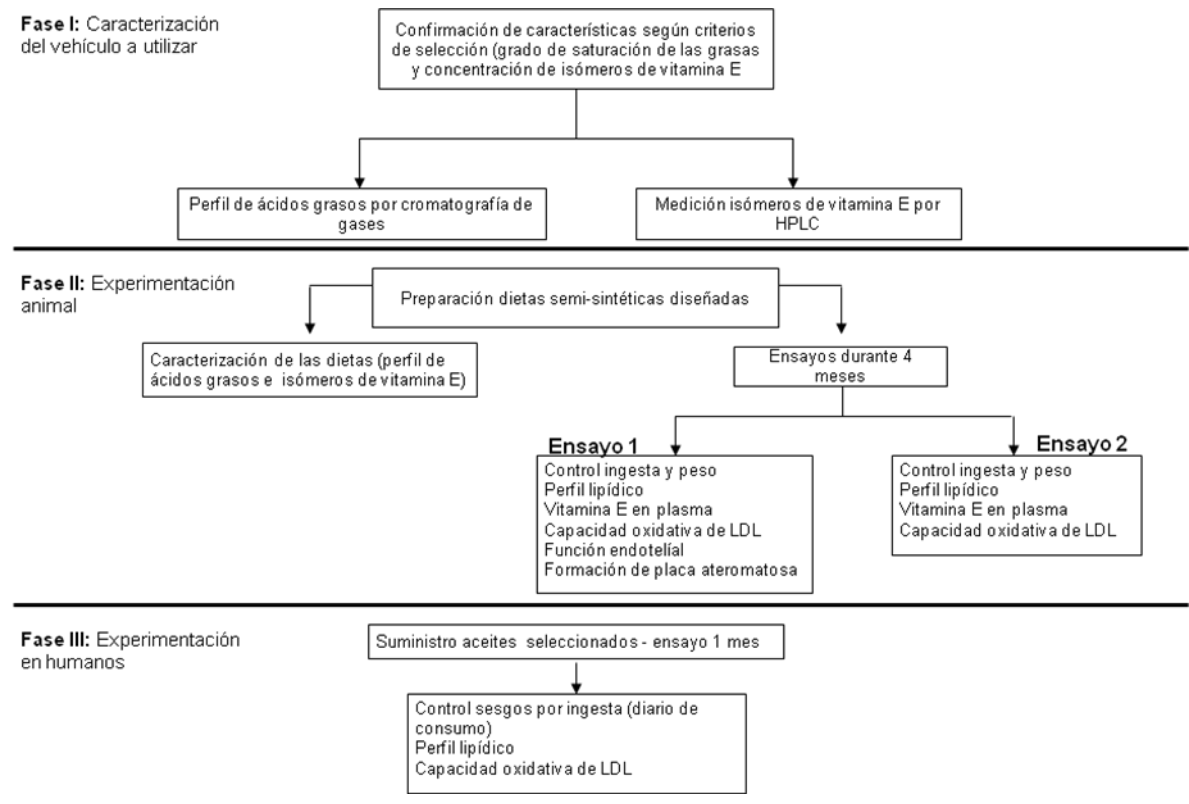


Figura 30: Esquema fases del estudio

4.1. Fase I: Caracterización del vehículo a utilizar en los experimentos:

Esta primera fase fue un estudio descriptivo que tuvo como finalidad asegurar que el vehículo de tocotrienoles (grasa y harina de trigo) a utilizar en la preparación de las dietas cumplía con las características deseadas para el estudio y previamente descritas en la literatura.

Múltiples reportes de la literatura ligan la saturación de las grasas y la ECV, siendo así, que desde la década de los 50's estudios epidemiológicos de Keys y colaboradores llamaron la atención a la relación que existe entre un mayor consumo de grasa saturada (AGS) y niveles elevados de colesterol sanguíneo (CoS) (Keys 1984).

Por lo anterior, para la selección de las grasas a utilizar en la preparación de las dietas se tuvo en cuenta no solo que fueran fuente o no del nutriente del que se quería evaluar el impacto (tocotrienoles), sino también el grado de saturación de cada una de ellas. En la Tabla 5 se presenta la distribución de las grasas a usar teniendo en cuenta el grado de saturación y el contenido de vitamina E, según lo reportado en la literatura (<http://nutritiondata.self.com/>).

Es importante resaltar que el aceite de palma híbrido se utilizó teniendo en cuenta que las normas técnicas Colombiana y Andina, la definen como un aceite de palma alto en oleico, lo cual le confiere una característica en cuanto a su proporción de AGS/AGI diferente al esperado con el aceite de palma tradicional (*Elaeis guinnensis*). (ICONTEC 2009; Comité Andino de Normalización 2009)

Tabla 5: Distribución de las grasas utilizadas según características

Características	Fuente de Tocotrienoles	No fuente de Tocotrienoles
Alto en AGS	Aceite de palma	
Alto en AGM	Aceite de palma híbrido	Aceite de oliva
Alto en AGP		Aceite de soya Aceite de girasol

Los aceites de palma fueron donados por CENIPALMA, los aceites de soya y girasol fueron donados por GRASCO y el aceite de oliva fue comprado comercialmente.

Teniendo en cuenta que los aceites a utilizar son productos naturales y que su contenido nutricional puede variar según el sitio y la época de cultivo, se analizaron los dos parámetros de interés (perfil de ácidos grasos y contenido de vitamina E) para asegurar que éstos si cumplieran con lo referido en la literatura.

4.1.1. Determinación del perfil de ácidos grasos en aceites

Este análisis se realizó en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander (IUS), siguiendo las normas ISO 5509 “Animal and Vegetable Fats and Oils – Preparation of Methyl Ester of Fatty Acids” (Anexo 1).

Para la obtención de FAME’s se realizó una transesterificación con metanol, catalizada con Trifloruro de Boro en solución metanólica al 12% w/v (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, WI, USA, Cat. No 26,412-1), obteniendo glicerol y esteres de metilo de los ácidos grasos (FAMES’s). Posteriormente se realizó una extracción de FAME’s con hexano.

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases H.P. 5890A Series II, equipado con un inyector split/splitless (250°C, relación split 1:40) y un detector de ionización en llama (FID); columna capilar de sílice fundida DB-Wax (60 m, 0.25 mm. d.i.) recubierta con fase estacionaria de polietilenglicol de 0,25 mm de espesor. La temperatura del horno se programó desde 100°C (5 min) hasta 136°C (1 min) a velocidad de 2°C/min y desde 136°C hasta 250°C (25 min) a 7 °C/min. Como gas de arrastre se

utilizó helio (99.99% AGA Fano S.A.) con presión de entrada a la columna de 200 Kpa. Los flujos de aire e hidrógeno para el FID fueron 300 y 30 mL min⁻¹ respectivamente. Como gas auxiliar se utilizó nitrógeno con una velocidad de flujo de 30 mL min⁻¹.

Para la identificación de los metilésteres de ácidos grasos presentes en las muestras se utilizó el método de comparación de sus tiempos de retención con los patrones certificados (mezcal de estándares GLC-10, GLC-50, GLC-70, GLC-80 y GLC-100, Matreya Inc., Pennsylvania, USA y Supelco™ 37 Componente FAME Mix, Supelco, Bellefonte, PA, cat No. 47885-U).

El porcentaje relativo (%) de ácidos grasos en las muestras analizadas se determinó según la norma ISO 5508- "Animal and Vegetable Fat and Oils – Analysis by Gas Chromatography of Methyl Ester of Fatty Acids" (Anexo 2). Los datos obtenidos en el análisis se procesaron a través del sistema de datos: HP Chemstation Rev.A.06.03

4.1.2. Determinación de las concentraciones de vitamina E en materia prima para las dietas

Este análisis se realizó en los laboratorios de CENIPALMA.

El análisis se realizó en un equipo de HPLC (Merck-Hitachi. Serie Lachrom) con detector de fluorescencia (Merck-Hitachi, L-7485) y columna con fase reversa (Chromolith RP-18e de 10 cm de longitud y 4.6 mm d.i.).

Como fase móvil se utilizó una mezcla de MeOH:H₂O con flujo 1.6 mL/min de acuerdo con la siguiente programación:

Tiempo (min)	Metanol (%)	Agua (%)
0	80	20
8.5	100	0
15	100	0
17	80	20

El procedimiento para la preparación de las muestras para ser inyectadas al HPLC se realizó siguiendo los pasos: 1) solubilización de 30 mg de la muestra (aceites) con cloroformo hasta lograr un volumen de 1 ml. 2) alícuota de 20 µL extracción líquido-líquido con hexano, 3) evaporación del hexano y 4) reconstrucción del extracto con etanol.

La lectura se hizo utilizando patrones certificados para tocoferoles y tocotrienoles de Calbiochem.

Finalmente, debido a que en uno de los ensayos animales se planteaba utilizar la harina integral de trigo (harina de tercera) en la preparación de algunas dietas, se realizó el respectivo análisis de su contenido de vitamina E para corroborar su viabilidad.

4.2. Fase II: Experimentación animal

Durante esta fase se desarrolló un estudio de tipo experimental en el cual se utilizó el conejo como modelo animal. Se escogió este modelo teniendo en cuenta que los conejos no sólo comparten diferentes aspectos del metabolismo de las lipoproteínas con los humanos, sino que además tienen la capacidad de presentar hipercolesterolemia a los pocos días de manipular su dieta. La hipercolesterolemia inducida por dieta en este modelo es debida a su inhabilidad de aumentar la excreción de esteroides (Kolodgie 1996), causando que el hígado incremente la síntesis de lipoproteínas ricas en colesterol (VLDL y LDL) (Yanni 2004).

Animales de experimentación

Se utilizaron conejos machos raza Nueva Zelanda que fueron adquiridos en la Cunicultura Bachué, Bogotá.

El principal objetivo de esta fase fue determinar el efecto que tienen los tocotrienoles naturales sobre algunos factores descritos como marcadores del riesgo cardiovascular en un modelo animal

Para cumplir este objetivo se diseñaron 2 ensayos:

4.2.1. Ensayo 1:

En este ensayo se comparó el efecto de la presencia de tocotrienoles utilizando como vehículo los aceites de palma común y de palma híbrida y tomando como fuente de grasa ingredientes altos en AGS, AGM y AGPI. Todas las dietas tenían un aporte de 0.1% de colesterol p/p para asemejar una dieta de un sujeto humano con la inclusión de un huevo tres veces por semana (Anexo 3).

Se utilizaron 20 conejos con 3-4 libras de peso inicial asignados al azar a uno de los cuatro tratamientos diseñados, 5 animales por grupo.

Las dietas para alimentar a los conejos se prepararon en Nutryr® siguiendo los lineamientos nutricionales recomendados para esta especie animal (<http://www.rabbitchow.com/>). Teniendo en cuenta la vasta experiencia de la compañía en la producción de alimentos concentrados para conejos, se utilizaron los mismos ingredientes que normalmente se utilizan produciendo el concentrado comercial utilizado en diversas cuniculturas, manipulando únicamente la fuente de grasa de cada dieta. Se diseñaron cuatro dietas que cumplieran con los postulados de fuente de grasa y fuente de tocotrienoles, así:

Característica	Fuente de Tocotrienoles	No fuente de Tocotrienoles
Alto en AGS	Aceite de palma	
Alto en AGM	Aceite de palma híbrido	
Alto en AGP		Aceite de soya
		Aceite de girasol

Para la preparación base de las dietas se utilizaron los siguientes ingredientes: harina de alfalfa, salvado de trigo, arroz cristal, cascarilla de cacao, melazas, torta de soya boliviana, harina de sangre, fuente de grasa según lo necesario en cada dieta (5% p/p), levadura de cerveza, sal base para ganado, carbonato de calcio, lisina-L, Alimet, cloruro de colina 60%, Nutryr I (minerales), Bovatec, Allzime Vegpro.

Los conejos se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de la Salle y su cuidado y manejo se hizo de acuerdo con los procedimientos y atendiendo a las condiciones éticas que aparecen en el documento “principios básicos para el manejo de animales de laboratorio” de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Anexo 4).

Una vez asignados a cada tratamiento, los conejos se ubicaron en jaulas individuales, las cuales estaban diseñadas para evitar la coprofagia que es fuente de ácidos grasos insaturados producidos por bacterias cecales.

El paso inicial del ensayo fue un proceso de adaptación de una semana para que el estrés por el que los conejos debían pasar debido a las nuevas condiciones (jaula y dieta) no interfiriera en los datos iniciales (basales) del estudio. Durante los primeros tres días, los conejos recibieron su dieta comercial usual y el objetivo fue sólo el acostumbrarlos a su nuevo ambiente. Durante los siguientes cuatro días se les adaptó a la dieta experimental mezclando a su dieta usual un 25% de la experimental, con incrementos diarios del 25% hasta lograr al cuarto día un consumo de 100% de dieta experimental.

A los animales se les ofreció 200 gramos de dieta por día, lo cual es considerado suficiente teniendo en cuenta que ellos ingieren aproximadamente el 5% de su peso en alimento y el 10% en agua (Yanni 2004). Diariamente se pesaba la comida sobrante para poder llevar un control detallado del consumo de cada conejo. Para esto se utilizó una báscula digital OHAUS. El consumo diario se obtuvo de la diferencia entre lo ofrecido y el sobrante, dato que se reportó en el formato desarrollado para tal fin (Anexo 5).

Así mismo, se llevó un control semanal de peso corporal de cada animal. El pesaje de los animales se realizó el lunes de cada semana en las horas de la mañana, antes de suministrar el alimento del día, utilizando una báscula de reloj. El dato recolectado se registró en el formato desarrollado para tal fin (Anexo 5)

Los análisis de perfil lipídico se realizaron al inicio del ensayo y cada 4 semanas hasta completar los cuatro meses de tratamiento. Para este procedimiento, los conejos se sedaron y la sangre se obtuvo de la vena marginal de la oreja luego de un ayuno de 12 horas. Las muestras de sangre se trasladaron al laboratorio de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Javeriana en donde se procesaron siguiendo las técnicas explicadas a continuación.

- *Colesterol total*: se utilizó el método enzimático colorimétrico SERA-PAK® Colesterol (Fast Color) de Bayer.

Este método se basa en que los ésteres de colesterol son hidrolizados por la enzima colesterol éster hidrolasa a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre existente, conjuntamente con el producido por esta reacción, es oxidado por la colesterol oxidasa a Δ^4 -colesteno y peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno (4-aminofenazona/ácido 2-hidroxifenilacético) a un compuesto de color rojo que se lee a 500 nm.

- *Colesterol HDL*: se utilizó el método de precipitación del fosfotungstato de SERA-PAK® de Bayer.

Este método se basa en que las HDL se separan de los quilomicrones, VLDL y LDL por la adición del reactivo de precipitación (ácido fosfotungstico-cloruro de magnesio) al plasma. Después de centrifugar, se determina el colesterol presente en las HDL del sobrenadante por el método enzimático colorimétrico.

- *Colesterol LDL*: se utilizó el método de precipitación con heparina de Ecoline® de Siemens.

El principio de éste método se basa en que las LDL se precipitan específicamente mediante la adición de heparina. Tras la centrifugación, las HDL, VLDL y los quilomicrones se quedan en el sobrenadante, en donde se determinan enzimáticamente el contenido de colesterol por el método enzimático colorimétrico. La concentración de colesterol LDL se calcula a partir de la diferencia entre colesterol total y el colesterol en el sobrenadante.

Adicionalmente, se determinó la concentración de ácidos grasos y vitamina E en plasma al momento cero y a los 4 meses de tratamiento.

- Para el análisis de la vitamina E en plasma, adicionalmente al procedimiento previamente detallado en la fase I, se siguieron los siguientes pasos: 1) separación del plasma por centrifugación (10 min a 10.000 rpm), 2) precipitación de la proteína del plasma con una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano, 3) extracción de los T3E con hexano, 4) evaporación del hexano, 5) reconstrucción del extracto con etanol y 6) adición de estándar interno (α tocoferol acetato).
- Para el análisis del perfil de ácidos grasos, adicionalmente al procedimiento previamente detallado se realizó la separación del componente lipídico.

Finalmente, luego del último sangrado, los conejos fueron sacrificados utilizando una sobredosis de pentotal por vía intravenosa (25 mg/Kg); posteriormente se realizó

diseción y aislamiento de la aorta torácica y abdominal para los posteriores análisis histológicos cuya técnica se describe a continuación:

- *Función endotelial:* realizada en la Fundación Cardio Infantil.

Se determinó en un equipo de perfusión de órganos in Vitro (Kent Scientific®).

Las aortas se cortaron en aros. Los aros fueron montados en el equipo y sometidos a máxima contracción con adrenalina. La función endotelial se expresó como porcentaje de relajación del aro con concentraciones crecientes de Acetilcolina. La capacidad de relajación del músculo liso de la media arterial se midió como porcentaje de relajación con concentraciones crecientes de nitroglicerina.

- *Formación de placa ateromatosa:* realizada en la Fundación Cardio Infantil.

La formación de placa ateromatosa se determinó utilizando tinción de Sudán Black. Para cuantificar el tamaño y espesor de la lesión se utilizó en algunos conejos el método de planimetría para análisis histológico. Para hacerlo, se lavó la aorta con solución buffer fosfato, 200cc y posteriormente con 200cc de paraformaldehído al 4%. Se hicieron secciones de sitios donde se observaba placa y se almacenaron al menos por 72 horas en paraformaldehído para luego embeberlos en parafina a 56-58°C y hacer cortes de 4 micras que fueron sometidos a tinción de Tricrómico elástica.

Los análisis de planimetría se hicieron utilizando un equipo de planimetría microscópica digital (Image Proplus, media Cibernetics) disponible en la Fundación CardioInfantil, tal como se describe a continuación:

a) Área luminal: área en mm^2 del lumen del segmento de aorta analizado, mediante el sistema automático del programa para análisis histomorfométrico utilizado.

b) Promedio de diámetro luminal: promedio en mm de dos diámetros perpendiculares del segmento de aorta analizado, tomado de la superficie endotelial-superficie endotelial.

c) Área del vaso: área en mm^2 del segmento de aorta analizado, a nivel de la lámina elástica externa mediante el sistema automático del programa para análisis histomorfométrico utilizado.

d) Grosor máximo de neo íntima (estría grasa): promedio de dos mediciones máximas en mm, del grosor de la neo íntima que se extiende desde la lámina elástica externa a la superficie endotelial.

e) Área de placa neointimal (estría grasa): área en micras de toda la neo íntima existente en el segmento de arteria examinado.

f) Relación neo íntima/media (mm^2): relación de dividir el área de neo íntima sobre el área de la túnica media.

g) Porcentaje del área luminal ocupado por la lesión.

h) Índice de lesión: área neo íntima/área total del vaso

Los conejos sacrificados fueron descartados teniendo en cuenta los procedimientos bioéticos estipulados.

4.2.2. Ensayo 2

El objetivo de este ensayo fue comparar el efecto de la presencia de tocotrienoles utilizando como vehículo el aceite de palma común y la harina de trigo y tomando como fuente de grasa aceites altos en AGS y AGM. Las dietas experimentales se prepararon siguiendo las mismas pautas que en el ensayo 1, pero a algunas de ellas se les adicionó colesterol (0.1% p/p), para determinar el efecto de los tocotrienoles bajo la condición de una dieta hipercolesterolémica.

Se utilizaron 80 conejos machos de la raza Nueva Zelanda con 3-4 libras de peso inicial, los cuales se mantuvieron en el área de experimentación de la Cunicultura Bachué y su cuidado y manejo se hizo de acuerdo con los procedimientos y atendiendo a las condiciones éticas que aparecen en el documento “principios básicos para el manejo de animales de laboratorio” de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Anexo 4).

Los conejos se dividieron en 8 grupos de diez conejos cada uno y cada grupo recibió la dieta correspondiente, así:

Característica	Alta en T3E	Muy alta en T3E	Baja en T3E
Alta en AGS	Aceite de palma	Aceite de palma + Trigo	
Alta en AGM	Aceite de oliva + Trigo		Aceite de Oliva
Alta en AGS + Colesterol	Aceite de palma + Colesterol	Aceite de palma + Trigo + Colesterol	
Alta en AGM + Colesterol	Aceite de oliva + Trigo + Colesterol		Aceite de oliva + Colesterol

Las 8 dietas utilizaron los mismos ingredientes base para asegurar que no se incluía sesgo en el experimento debido a diferencia en aporte nutricional y sólo se ajustó la fuente de grasa (5% p/p), inclusión de harina de trigo (en este caso se disminuyó la cantidad de alfalfa de la mezcla) y la adición de 0.1% colesterol al 99.9% (Sigma[®]) para las dietas altas en colesterol.

En cuanto a la adición de colesterol a las dietas, se utilizó 0.1%, para asemejarlas a lo que sería una dieta de un sujeto humano con la inclusión de un huevo diario (441 mg colesterol/día) (Anexo 3).

Tabla 6: Ingredientes utilizados en la preparación de las dietas

DIETA SIN T3E	DIETA CON T3E DEL ACEITE	DIETA CON T3E DE LA HARINA	DIETA CON T3E DEL ACEITE Y LA HARINA
Oliva Oliva + Colesterol*	Palma Palma + Colesterol*	Oliva + Trigo Oliva + Trigo + Colesterol*	Palma + Trigo Palma + Trigo + Colesterol*
Alfalfa Arroz cristal Cascarilla de cacao Melaza Torta de soya Harina de sangre Levadura de cerveza Sal base para ganado Phosbic Carbonato de calcio Lisina L Alimet Cloruro de colina Nutryr I (minerales) Bovatec Allzime Vegpro	Alfalfa Arroz cristal Cascarilla de cacao Melaza Torta de soya Harina de sangre Levadura de cerveza Sal base para ganado Phosbic Carbonato de calcio Lisina L Alimet Cloruro de colina Nutryr I (minerales) Bovatec Allzime Vegpro	Alfalfa Arroz cristal Cascarilla de cacao Melaza Torta de soya Harina de sangre Levadura de cerveza Sal base para ganado Phosbic Carbonato de calcio Lisina L Alimet Cloruro de colina Nutryr I (minerales) Bovatec Allzime Vegpro	Alfalfa Arroz cristal Cascarilla de cacao Melaza Torta de soya Harina de sangre Levadura de cerveza Sal base para ganado Phosbic Carbonato de calcio Lisina L Alimet Cloruro de colina Nutryr I (minerales) Bovatec Allzime Vegpro
Aceite de oliva	Aceite de palma	Aceite de oliva Harina de trigo	Aceite de palma Harina de trigo
* 0.1% colesterol	* 0.1% colesterol	* 0.1% colesterol	* 0.1% colesterol

Luego de ser aleatorizados a cada tratamiento, los conejos se colocaron en jaulas individuales. Las jaulas estaban diseñadas para evitar la coprofagia que es fuente de ácidos grasos insaturados producidos por bacterias cecales.

Al igual que en el ensayo 1, en éste se siguieron las mismas indicaciones y/o técnicas para la adaptación, control de ingesta, pesaje de los animales y análisis del perfil lipídico. Adicionalmente, utilizando sangre obtenida a los cuatro meses, se realizó el análisis de la capacidad oxidativa de las LDL.

Capacidad oxidativa de las LDL: Para realizar esta determinación primero se separaron las LDL en el laboratorio de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Javeriana siguiendo la metodología de precipitación con heparina descrita anteriormente. Posteriormente, las LDL ya separadas se llevaron a cabo en la Universidad Jorge Tadeo Lozano en donde se siguió el procedimiento descrito por Esterbauer y col para determinar la susceptibilidad a peroxidación en el cual, las LDL son oxidadas *in vitro* con CuSO₄ por un periodo de 8 horas. El grado de oxidación de las LDL fue seguido mediante la determinación de la absorbancia a 234 nm como indicador de la formación de dienos conjugados que son el primer estadio del proceso oxidativo (Esterbauer 1989; Esterbauer 1992).

El proceso de peroxidación (oxidación de las LDL) se puede reproducir *in vitro* aprovechando el hecho de que sólo los AGPI presentes en las lipoproteínas pueden comenzar el proceso de peroxidación en presencia de Cu⁺ y que sólo los dobles enlaces conjugados absorben el UV a una longitud de onda de 234 nm. El proceso tiene una fase de latencia generalmente larga y eventualmente se comienzan a detectar los dobles

enlaces conjugados. La concentración de dobles enlaces conjugados no se puede expresar en moles/l u otra medida semejante, ya que un mismo ácido graso puede tener dos o cuatro y hasta seis dobles enlaces. Por consiguiente, la densidad óptica (D.O.) no refleja la concentración de AGPI presentes en las lipoproteínas, sino los dobles enlaces conjugados que se forman, lo que a su vez, depende de la cantidad de AGPI presentes en las lipoproteínas.

La formación relativa de dobles enlaces conjugados que, a su vez, refleja el proceso de peroxidación y posibilidad de captación y no metabolización de los productos por los macrófagos, se puede ver a través de las diferencias en D.O. que se encuentren entre lipoproteínas. Una aproximación a una cuantificación de la peroxidación se puede lograr recurriendo a la ley de Beer-Lambert, conociendo que el coeficiente de extinción molar de los dobles enlaces conjugados es de 29500 L/mol. Por consiguiente, se puede tomar un tiempo, en nuestro caso 5 horas de incubación, y calcular las micro moles de dobles enlaces conjugados presentes en ese momento a partir de la D.O. de la mezcla incubada, teniendo en cuenta que ésta no es una concentración absoluta toda vez que, a medida que se forman, continúan el proceso y sólo se puede decir que a las cinco horas de incubación había una diferencia de N micro moles entre los incubados.

Lo anterior sólo refleja la susceptibilidad a peroxidación que tienen las lipoproteínas, dependiendo de su composición de ácidos grasos poliinsaturados y no pretende dar números absolutos.

4.3. Fase III: Experimentación en humanos

El principal objetivo de esta Fase fue evaluar el efecto de los tocotrienoles naturales adicionados a la dieta usual de individuos sanos sobre el perfil lipídico y la capacidad oxidativa de las LDL.

En esta etapa del estudio se realizó una selección de la muestra por conveniencia, en la cual se tomaron 30 mujeres voluntarias entre 18 y 30 años que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: perfil lipídico normal ([en mg/dl]: TG <150, colesterol <200); IMC entre 18.5 y 25; ingesta habitual que cubriera sus necesidades nutricionales según edad, género y actividad física; no fumadoras; no consumidoras habituales de alcohol (máximo 50 ml etanol por semana); no consumo de medicamentos hipolipemiantes en los tres últimos meses ni suplementos vitamínicos; sanas por historia médica y familiar. Igualmente, a todas las participantes se les realizó una prueba de Proteína C reactiva (PCR) para descartar algún tipo de proceso infeccioso. Estos criterios de inclusión se determinaron para excluir factores que pudieran influir sobre el perfil lipídico de los individuos.

Todas las voluntarias que se presentaron para el estudio fueron informadas del propósito y de la metodología a seguir durante el desarrollo y firmaron el consentimiento informado (Anexo 6). Las personas interesadas en participar fueron sometidas a la "Encuesta de Salud, Nutrición y Alimentación" que fue diseñada por Martha Díaz, profesora del Departamento de Nutrición y Bioquímica, la cual se ajustó para evaluar los factores de inclusión previamente establecidos en este estudio (Anexo 7). Esta encuesta ha sido utilizada durante más de 10 años en los estudios de nutrición realizados por el Departamento de Nutrición y Bioquímica de la Universidad Javeriana y fue diseñada en el

marco del proyecto de Colciencias que evaluó el riesgo cardiovascular dependiente de factores nutricionales liderado por la Nutricionista Díaz.

Las voluntarias que cumplieron con los criterios de inclusión evaluados en esta etapa, fueron citadas para la evaluación del perfil lipídico que se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias, siguiendo las técnicas descritas en la fase anterior (Fase II).

Las voluntarias que cumplieron este último criterio de inclusión fueron citadas a consulta individual para iniciar el tratamiento al cual fueron asignadas al azar.

Característica	Fuente de Tocotrienoles	No fuente de Tocotrienoles
Alto en AGS	Aceite de palma	
Alto en AGPI		Aceite de soya

Durante la primera consulta, las participantes recibieron instrucciones de cómo realizar la inclusión de los aceites dentro de su patrón de alimentación y cómo llevar un diario de ingesta (Anexo 8). Para el entrenamiento en el llenado del diario se utilizaron tanto los modelos de alimentos de porciones promedio marca NASCO® (Anexo 9) como utensilios de medición como tazas, pocillos, cucharas, etc.

Cada grupo de sujetos mantuvo su dieta habitual por todo el periodo de tratamiento (30 días), pero la preparación de los alimentos la hicieron con el aceite suministrado. Las únicas modificaciones que debieron realizar a su patrón habitual de alimentación fueron eliminar el consumo de productos integrales con el fin de controlar la otra fuente posible de T3E diferente al aceite y evitar el consumo de preparaciones fritas cuando consumían alimentos fuera de su casa para disminuir el aporte de otros aceites.

A cada persona se le suministró semanalmente una cantidad medida de aceite que aportaba la cantidad de vitámeros recomendada diariamente para este grupo étnico de la población colombiana (www.icbf.gov.co/icbf/directorio/portel/libreria/pdf/tabla-recomenda.pdf) para que lo utilizara en la preparación de sus alimentos. En los casos en que el sujeto vivía con su familia, se le suministró el aceite necesario para toda la familia con el fin de así facilitar el cumplimiento de la dieta.

Se determinó una intervención de 30 días teniendo en cuenta que de acuerdo con estudios reportados en la literatura para determinar el efecto de componentes de la dieta sobre el perfil lipídico en humanos el tiempo de intervención generalmente aceptado es de treinta días, período suficiente para que se manifiesten cambios o alteraciones. Adicionalmente, un período de sólo treinta días aseguró que la persona (y su familia en los casos en que viviera con ellos) cumpliera con el tratamiento puesto que aun cuando no debían hacer modificaciones drásticas en sus hábitos alimentarios, sí implicaba registrar todo lo consumido durante los días de tratamiento y esto se podía tornar dispendioso.

Debido a que la dieta podía ser un factor de confusión en el estudio, para su evaluación durante el período experimental los sujetos llevaron un diario de la ingesta de alimentos que se recogió cada semana al momento de entregar la porción de aceite correspondiente con el objetivo de constatar la manera como se estaban cifiendo a las indicaciones

suministradas. Todas las entrevistas de tamizaje y seguimiento fueron realizadas por una nutricionista entrenada para evitar sesgos en la recolección de la información.

Los diarios de ingesta reportados semanalmente se analizaron para controlar que todos los sujetos mantuvieron una dieta lo más constante posible y así controlar un sesgo dietario que pudiera tener impacto sobre los resultados del estudio.

Teniendo en cuenta que los diarios fueron reportados en porciones comunes (taza, cuchara, etc), ésta información se convirtió a gramos/cc (Anexo 10) y se analizó utilizando un aplicativo del programa EXCEL en el cual previamente se había digitado el contenido nutricional en 100 gramos de los alimentos de uso común en Colombia reportados en la Tabla de Composición de Alimentos publicada por el Centro de Orientación Nutricional. Los nutrientes analizados fueron: proteínas, grasa total, grasa saturada, grasa monoinsaturada, grasa poliinsaturada, carbohidratos, calcio, fosforo, hierro, sodio, potasio, magnesio, zinc, cobre, retinol (vitamina A), tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), piridoxina (B₆), ácido fólico, cianocobalamina (B₁₂), ácido ascórbico (C) y tocoferol (E) (Anexo 11).

Al finalizar el mes de tratamiento, se tomó una muestra de sangre a todos los sujetos previo ayuno de 12 horas. Con esta muestra se determinó el perfil lipídico y la capacidad oxidativa de las LDL siguiendo las técnicas descritas anteriormente.

4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó bajo los paradigmas de la estadística bayesiana. La estadística, como disciplina científica, se divide en dos ramas que se basan en posiciones filosóficas divergentes, conocidas como la estadística frecuentista y la estadística bayesiana. La inmensa mayoría de los análisis que se presentan en las publicaciones biomédicas se basan en el paradigma frecuentista, esta forma de análisis, muy popular y divulgada, paradójicamente no es en general bien comprendida por los especialistas de las diferentes áreas del conocimiento. Su uso extensivo y en ocasiones indiscriminado ha conducido a que "...los hallazgos de la investigación médica son vistos a menudo con un considerable escepticismo..." (Sterne 2001); por ese motivo muchas publicaciones en diferentes áreas del conocimiento prohíben o desestiman el uso de las pruebas de hipótesis tal y como se refiere en las Normas de Vancouver (International Committee of Medical Journal Editors 1977). Muchos autores han referido cómo las pruebas de hipótesis se han convertido en criterios dogmáticos que bajo un fuerte esquematismo son aplicados con un divorcio total del contexto del problema de investigación (Rozeboom 1960; Gigerenzer 1998). La división de los resultados de los análisis en "significativos o no" ha desvirtuado el sentido del análisis de los datos y ha impedido el análisis objetivo de los efectos bajo estudio y de los efectos del azar sobre sus estimaciones (Monterrey 2012). Dentro de las soluciones propuestas para mejorar el análisis de los datos de la investigación se ha propuesto por múltiples autores la aplicación de la estadística bayesiana (Goodman 1990; Sohlberg 2005; Thorburn 2005), este enfoque es más racional pues, en primer lugar, se asemeja a los procesos de análisis de los resultados de

la investigación al obtener la información a posteriori partiendo de la información existente, la que es modificada por los resultados del estudio; en segundo lugar la solución bayesiana a los problemas de análisis de los datos se basa en la determinación de la distribución de los valores a estimar con lo que el análisis se basa en los valores plausibles de los efectos bajo estudio. En la actualidad la estadística bayesiana va ocupando un espacio preponderante dentro de la estadística gracias, en primer lugar, a que con ella se identifican evidencias válidas para el estudio que se analiza, lo cual no sucede en la estadística frecuentista, donde las evidencias surgen de múltiples repeticiones del experimento y en segundo lugar, al desarrollo de la computación y de poderosos algoritmos para el cálculo de integrales a partir de procesos de simulación como los algoritmos tipo MCMC (Markov Chain Monte Carlo Methods).

En este contexto en la actualidad la estadística bayesiana y sus procedimientos, más racionales y comprensibles que los de la estadística frecuentista, van siendo utilizados en la solución de múltiples problemas.

Teniendo en cuenta lo anterior, los datos fueron descritos mediante la media, desviación estándar, mínimo y máximo. Para representar los cambios de las medidas de resumen en los diferentes momentos del estudio, se utilizaron diagramas de tendencia. Las distribuciones de las mediciones fueron representadas utilizando diagramas de tipo BOX-PLOT. El análisis del comportamiento de los diferentes parámetros de interés se realizó utilizando procedimientos de la estadística bayesiana a partir de modelos que fueron construidos en dependencia de las características del experimento. Para la construcción de las distribuciones a posteriori fueron utilizados, en todos los casos, priors no informativos: Para las medias se consideró una distribución a priori normal con media 0 y precisión 10^{-4} , para la distribución a priori de la varianza se consideró la distribución gamma con parámetros 0.01. La representación de las distribuciones a posteriori se realizó utilizando diagramas de tipo cajas y bigotes en los que las cajas fueron construidas con los percentiles 25, 50 y 75 de la distribución y los bigotes con los percentiles 2,5 y 97,5 respectivamente. De esta forma el diagrama de cajas brinda una estimación del correspondiente efecto mediante un intervalo de confianza bayesiano –intervalo de credibilidad- del 95%, los que fueron utilizados como criterios de estimación de los efectos bajo estudio.

La determinación de las distribuciones a posteriori se realizó, para todos los modelos ajustados, aplicando un algoritmo de Montecarlo para construir cadenas de Markov. Esto se realizó en el sistema WINBUGS, basado en el muestreador de Gibbs, siguiendo los siguientes criterios para la ejecución del procedimiento numérico de estimación: 1000 iteraciones iniciales para acondicionar el sistema en la fase inicial –burning-, 100 000 iteraciones finales para obtener las estimaciones, refrescando la muestra cada 100 iteraciones y diluyendo el proceso cada 10 iteraciones

En el Ensayo animal 1 (Fase II) se utilizó un modelo de análisis de la varianza clasificación simple para analizar la homogeneidad de los grupos al inicio del estudio, es decir en el Momento 1 de medición. La primera parte del Anexo 12 presenta el programa utilizado para construir la distribución a posteriori del efecto de los diferentes tipos de grasa sobre las diferentes variables del perfil lipídico al inicio del estudio, así como las características del modelo utilizado. Para controlar el efecto de la variabilidad biológica de los conejos y la acumulación de exposición determinada por los diferentes momentos del

estudio sobre el efecto de los diferentes tipos de grasas en el estudio, se ajustó un modelo de efectos mezclados para observaciones repetidas que se indica en la segunda parte del Anexo 12; en el que aparece también el programa de WINBUGS utilizado para construir las distribuciones a posteriori para los componentes del modelo.

En el ensayo animal 2 (Fase II) también se utilizó un modelo de efectos mezclados para observaciones repetidas. La modelación utilizada en este caso se presenta en el Anexo 13.

En el ensayo con humanos (Fase III) se utilizó un modelo de análisis de la varianza clasificación simple para analizar la homogeneidad de los grupos al inicio del estudio y un modelo de análisis de covarianza para analizar el efecto de los dos tipos de aceite sobre los cambios en el perfil lipídico, controlando las variables de la ingesta de grasa y vitamina E de la dieta usual de los individuos. La modelación utilizada en este caso se presenta en el Anexo 14.

Para el procesamiento estadístico fueron utilizados los sistemas EXCEL, PowerPoint, SPSS versión 16, EpiDat y WINBUGS 1.4.3 (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>)

5. RESULTADOS

5.1. Fase I, Caracterización del vehículo a utilizar en los experimentos

Toda vez que el objetivo de la fase experimental era determinar el efecto que pudieran tener dietas con contenidos altos de tocotrienoles, así como el efecto que pudieran tener los tocotrienoles naturales en aquellas dietas con una relación alta en ácidos grasos saturados/ácidos grasos monoinsaturados/poliinsaturados sobre el perfil lipídico, la fase I consistió en caracterizar las diferentes dietas experimentales y sus componentes.

En la Tabla 7 se presenta el porcentaje relativo de los ácidos grasos encontrado en los diferentes aceites empleados en la preparación de las dietas.

Como se puede observar, los resultados del análisis del perfil de ácidos grasos en aceites demostró que la palmoleína tiene el mayor porcentaje de ácidos grasos saturados, mientras que la palmoleína híbrida y el aceite de oliva tienen la mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados. Por el otro lado, tanto el de girasol como el de soya tienen una mayor proporción de poliinsaturados entre los que predomina el linoléico. En cuanto a la relación AGS/AGI, la palmoleína y la palmoleína híbrida tienen una relación alta (0.93 y 0.64), mientras que la de los otros aceites es baja: oliva, 0.43; girasol, 0.13 y soya 0.21. Nótese la relativamente baja relación AGS/AGI de la palmoleína híbrida y el hecho de que la concentración de ácido oleico sea prácticamente igual a la del aceite de oliva. La palmoleína también contiene una alta proporción (40%) de ácido oleico tan sólo 9% menor a la del de oliva. Nótese, también, que en las dos palmoleínas el principal ácido graso saturado es el palmítico.

Como se comentó anteriormente, la Vitamina E está compuesta de ocho vitámeros, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que no se encuentran en igual proporción en los aceites vegetales. Por esta razón fue necesario determinar la concentración de estos componentes en cada uno de los aceites utilizados para la preparación de las dietas. Las concentraciones de los isómeros de los tocoferoles y tocotrienoles se presentan en la Tabla 8. El método cromatográfico utilizado para esta determinación no permite distinguir entre los vitámeros β y γ , por lo que se reporta como la suma de los dos.

Tabla 7: Porcentaje relativo de ácidos grasos en los aceites utilizados en la preparación de las dietas

ACIDO GRASO	Palmoleína	Palomoleína híbrida	Oliva	Girasol	Soya
	g/100 g				
Cáprico (C10:0)	N.S.*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Láurico (C12:0)	0.4	0.2	0.6	N.S.	N.S.
Mirístico (C14:0)	0.9	0.4	0.8	0.1	0.1
Pentadecanoico (C15:0)	N.S.	0.1	0.2	N.S.	N.S.
Palmítico (C16:0)	41.9	34.4	16.3	6.9	12.3
Heptadecanoico (C17:0)	0.1	0.1	0.7	N.S.	0.1
Estearico (18:0)	4.6	3.9	10.3	3.9	4.5
Araquídico (C20:0)	0.2	N.S.	0.7	N.S.	0.2
Behénico (C22:0)	0.1	N.S.	0.4	0.7	0.4
Tricosanoico (C23:0)	N.S.	N.S.	0.1	N.S.	N.S.
TOTAL AGS	48.2	39.1	30.1	11.6	17.6
Palmotoleico (C16:1)	0.1	0.3	0.6	0.1	0.1
Oleico (C18:1n9c)	40.3	48.4	49.9	24.4	22.3
Galedónico (20:1)	N.S.	N.S.	0.2	N.S.	N.S.
TOTAL AGM	40.4	48.7	50.7	24.5	22.4
Linoléico (C18:2n6c)	10.8	11.4	16.9	63.4	53.2
Linolénico (C18:3n3)	0.3	0.4	1.7	0.2	6.4
Araquidónico (C20:4n6)	0.2	0.3	N.S.	0.3	0.4
Eicosadienoico (C20:2n6c)	0.1	0.1	0.6	0.1	N.S.
TOTAL AGPI	11.4	12.2	19.2	64	60

*NS: Aporte no significativo de este componente

Como se deduce de la Tabla 8, sólo las dos palmoleínas contienen tocotrienoles, mientras que los aceites de oliva y soya sólo tienen tocoferoles. El aceite de girasol contiene una cantidad muy baja de tocotrienoles en relación con los aceites de palma. Nótese que la palmoleína híbrida contiene 46% más tocotrienoles que la palmoleína, lo cual se puede deber a características individuales de esta especie. Es importante resaltar el hecho de que estos procesos disminuyen la concentración de tocotrienoles en el producto comercial. Sin embargo, en el caso de nuestras dietas, los datos aseguran que la palmoleína híbrida suministra una mayor cantidad de tocotrienoles que cualquiera de los otros aceites utilizados en las dietas experimentales. Nótese también que la concentración de tocotrienoles fue hasta 4 veces superior que la de los tocoferoles, por lo que se puede esperar que el efecto que se pueda obtener se deba atribuir a los tocotrienoles. Esta presunción se reforzará teniendo en cuenta la ausencia de una cantidad significativa de tocotrienoles en los aceites de oliva, girasol o soya.

Tabla 8: Vitámeros de vitamina E en los aceites utilizados en las dietas

VITAMINA E	Palmoleína	Palomoleína híbrida	Oliva	Girasol	Soya
	p.p.m				
Tocotrienoles					
α	277	240.3	8	22.4	0
$\beta + \gamma$	469.1	848	0	6.6	0
δ	63.6	101.6	0	7.2	0
Total	809.7	1189.9	8	36.2	0
Tocoferoles					
α	201.3	91.9	188	456.7	96.2
$\beta + \gamma$	10.9	0	8	36.1	893.8
δ	16.7	0	0	23.4	640.2
Total	228.9	91.9	196	516.2	1630.1

5.2. Fase II, Experimentación animal

5.2.1. Caracterización de las dietas preparadas para ser utilizadas en los ensayos animales

Como se presentó en la metodología, las dietas debían presentar unas características específicas en cuanto a:

1. Tipo de ácidos grasos principales: AGS, AGM, AGPI
2. Aporte de vitamina E: T3E, TF.

Por lo anterior, una vez preparadas las dietas, éstas fueron analizadas inicialmente con un análisis proximal y posteriormente en su perfil de ácidos grasos y contenido de vitamina E para determinar si cumplían con lo postulado durante su formulación y así poder utilizarlas en los ensayos. A continuación, se presenta el análisis de cada una de las dietas (Tablas 10 – 15)

Como se puede observar, aun cuando a las dietas sólo se les adicionó el 5% de grasa p/p, el análisis proximal demostró que tenían un 7.3%. La grasa adicional proviene de otros componentes utilizados, como por ejemplo la torta de soya y la harina de sangre que tenían cantidades variables de grasa (Tabla 9).

Tabla 9: Análisis proximal de las dietas preparadas para el ensayo 1

Proteína	Grasa	Carbohidratos	Cenizas	Fibra cruda	Humedad
%					
16.2	7.3	58	6.6	11.8	11.5

Teniendo en cuenta esta situación, se determinó la composición de ácidos grasos y vitamina E en las dietas preparadas. En las Tablas 10 y 11 aparece esta composición.

Como se puede observar en la Tabla 10, las dietas preparadas con palmoleínas tienen una relación alta AGS/AGI: Palmoleína, 0,49 y palmoleína híbrida, 0,42. Por el otro lado, la relación para los aceites de girasol y de soya es baja: girasol, 0,25 y soya 0,27.

Tabla 10: Porcentaje relativo de ácidos grasos de dietas preparadas en el ensayo 1

ACIDO GRASO	Fuente de grasa de la dieta:			
	Palmoleína	Palomoleína híbrida	Girasol	Soya
	Porcentaje relativo			
Láurico (C12:0)	0,3	0,3	0,1	0,2
Mirístico (C14:0)	0,6	0,4	0,3	0,3
Pentadecanoico (C15:0)	0,1	0,1	0,1	0
Palmítico (C16:0)	28,4	25,4	15,9	16,8
Heptadecanoico (C17:0)	0,1	0,1	0,1	0,1
Estearico (18:0)	3,4	2,7	3	3,1
Araquídico (C20:0)	0,3	0,3	0,3	0,3
Behénico (C22:0)	0	0,2	0,4	0,3
TOTAL AGS	33,2	29,5	20,2	21,1
Palmitoleico (C16:1)	0,2	0,3	0,2	0,1
Oleico (C18:1n9c)	31,4	35,1	24,2	21,9
TOTAL AGM	31,6	35,4	24,4	22
Linoléico (C18:2n6c)	31,4	31,8	52	51,4
Linolénico (C18:3n3)	3,2	3	3,1	5,2
Araquidónico (C20:4n6)	0,4	0,3	0,4	0,4
TOTAL AGPI	35	35,1	55,5	57

En el caso de los componentes de la vitamina E, la Tabla 11 muestra que la dieta de palmoleína provee aproximadamente 8.8 mg de tocotrienoles por día (58.4 ppm x 150 gm consumo promedio diario), la híbrida 10.8 mg, la de girasol 1,1 mg y la de soya, 0,5 mg.

Por el otro lado, las palmoleínas proveen entre 4 y 8 mg diarios de tocoferoles, mientras que los de soya y girasol proveen entre 16 y 22 mg diarios. Es claro, por tanto, que las dietas se diferencian marcadamente en el contenido relativo de T3E y TF como en la relación AGS/AGI.

Tabla 11: Análisis de la vitamina E en dietas preparadas en el ensayo 1

VITAMINA E	Palmoleínas	Palomoleína híbrida	Girasol	Soya
	p.p.m.			
TOCOTRIENOS				
α	2,4	2,3	0,9	0,4
$\beta + \gamma$	44	56,9	3,6	1,1
δ	12	12,5	2,8	2,1
Total	58,4	71,7	7,3	3,6
TOCOFEROS				
α	2.7	2.6	3.1	20.3
$\beta + \gamma$	15.3	16.3	26.8	48.8
δ	22.8	23.8	51.6	41.0
Total	40.8	22.7	81.5	110.1

Como se puede observar en la Tabla 11, las dietas preparadas con girasol y soya presentaron cantidades no esperadas de tocotrienos, razón por la cual se evaluaron todos los ingredientes de las dietas para determinar la procedencia de los T3E. La harina de trigo de tercera fue el único ingrediente en el que se encontró presencia de este nutriente, siendo la primera vez que se reporta este hallazgo a nivel mundial. La Tabla 12 presenta el análisis discriminado de los vitámeros E encontrados en la harina de tercera.

Tabla 12: Análisis de la vitamina E en la harina de trigo de tercera

Tocoferoles			Tocotrienos		
α	$\beta + \gamma$	δ	α	$\beta + \gamma$	δ
ppm					
45.8	317.2	470	156.3	327.4	0

Teniendo en cuenta la información anteriormente descrita, se decidió incorporar la harina de trigo al experimento (ensayo 2) de una manera controlada, siendo así que al momento de preparar las dietas se dividieron en dos grupos (con y sin harina de trigo).

Para el segundo ensayo, se siguió la misma metodología y se determinó tanto el porcentaje relativo de ácidos grasos como la concentración de los componentes de la VitE. (Tablas 13 - 15)

Como se puede observar en la Tabla 13, las dietas, al igual que en el ensayo 1, presentaron un porcentaje de grasa superior al añadido como ingrediente base (5%) debido al aporte de grasa de los otros ingredientes adicionados. Sin embargo, el análisis proximal muestra que los dos tipos de dietas formulados son similares y cumplen con los requisitos nutricionales para el adecuado crecimiento de los animales de experimentación.

Tabla 13: Análisis proximal de las dietas preparadas para el ensayo 2

DIETA	Proteína	Grasa	Carbohidratos	Cenizas	Fibra cruda	Humedad
	%					
Sin harina de trigo	16	7.4	57.6	6.9	11.8	11.3
Con harina de trigo	15.9	7.5	58.3	6.5	12.1	11.4

La Tabla 14 muestra que la proporción de AGS/AGI en las dietas preparadas con aceite de oliva es menor que en las dietas preparadas con aceite de palma, independientemente de la adición de colesterol o de harina de trigo. Es interesante señalar el incremento en el contenido de ácido esteárico aportado por la harina de trigo integral, que lógicamente contiene los aceites del germen.

Tabla 14: Porcentaje relativo de ácidos grasos en las dietas preparadas en el ensayo 2

ACIDO GRASO	Oliva	Oliva + Trigo	Palma	Palma + Trigo	Oliva + Col	Palma + Col	Oliva + Trigo + Col	Palma + Trigo + Col
	PORCENTAJE RELATIVO							
Láurico (12:0)	0.6	0.4	0.7	0.5	0.7	0.7	0.4	0.5
Mirístico (14:0)	0.8	0.4	0.9	1	0.6	1	0.5	0.9
Pentadecanoico (15:0)	0.4	0.1	0.1	N.S.	0.2	0.1	0.1	0.2
Palmítico (16:0)	16.3	14.6	35.7	30.3	16.7	36.2	14.5	28.7
Heptadecanoico (17:0)	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3
Estearico (18:0)	10.2	15.1	9.8	13.8	10.8	9.4	15.4	14.8
Araquídico (20:0)	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6
Behénico (22:0)	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4
Tricosanoico (23:0)	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TOTAL AGS	30.1	31.90	48.40	47.10	30.50	48.60	32.20	46.50
Palmitoleico (16:1)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.5	0.3	0.4	0.2
Elaídico (t18:1)	0.5	0.5	0.5	0.3	0.4	0.4	0.7	0.5
Oleico (c18:1)	47.1	48.2	33.2	35.2	47.4	33.5	48	34.1
Galedónico (20:1)	0.2	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2
TOTAL AGM	48.3	49.4	34.2	36.1	48.5	34.4	49.4	35
Linoléico (18:2)	18.9	16	15.1	14.8	18.5	14.9	15.9	16
Linolénico (18:3)	1.9	2.1	1.7	1.5	1.9	1.6	2	2
Cis-Docosahexaenoico (22:6 n3)	0.8	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5
TOTAL AGPI	21.6	18.7	17.4	16.8	21	17	18.4	18.5

Como se puede observar en la Tabla 15, la harina de trigo aporta en la dieta del orden de 20 mg de T3E diarios, mientras que la palmoleína aporta los mismos 12 mg diarios del ensayo 1. Estas cifras son aditivas, de manera que la dieta que contiene aceite de palma y harina de trigo aporta alrededor de 30 mg por día. El colesterol, como es de esperar, no aporta Vit E a la dieta.

Tabla 15: Análisis de la vitamina E en dietas preparadas en el ensayo 2

DIETA	T3E	TF	TOTAL VIT E
	p.p.m.		
Aceite de oliva	3.9	14.9	18.8
Aceite de oliva + Colesterol	4.0	15.1	19.1
Aceite de oliva +Trigo	98.9	180.1	279.0
Aceite de oliva +Trigo + Colesterol	99.5	178.9	278.4
Aceite de palma	53.0	18.7	71.7
Aceite de palma + Colesterol	52.4	18.6	71.0
Aceite de palma +Trigo	148.8	183.7	332.5
Aceite de palma +Trigo + Colesterol	149.5	184.0	333.5

5.2.2. Ensayo 1

El principal objetivo de este ensayo fue determinar el efecto que tienen los tocotrienoles naturales en dietas semisintéticas con diferente aporte de ácidos grasos sobre el perfil lipídico y la función endotelial en un modelo animal.

Como se puede observar en la Tabla 16 y en la figura 31, los diferentes grupos presentaron una homogeneidad en el peso, la cual se mantuvo durante todo el experimento. Esta puede ser el resultado de unas condiciones similares de actividad física y de ingesta (148.9 g/día para el tratamiento con aceite de palma, 152.3 g/d para el tratamiento con palma híbrida, 148.5 g/d para el tratamiento con girasol y 146.9 g/d para el tratamiento con soya).

Tabla 16: Descripción de los peso en gramos durante los cuatro meses de tratamiento

Semana	Palma Hibrida	Palma	Girasol	Soya
	Promedio \pm D.S.			
0	2009 \pm 119.8	2165 \pm 181.7	2092 \pm 200	2162 \pm 190.5
1	2460 \pm 144.3	2365 \pm 112.6	2360 \pm 195.1	2345 \pm 111
2	2735 \pm 165.5	2620 \pm 108.1	2630 \pm 138.5	2550 \pm 113.2
3	2928 \pm 184.6	2831 \pm 152	2768 \pm 192.5	2758 \pm 145.5
4	3086 \pm 200.8	2958 \pm 152.5	2905 \pm 241.1	2902 \pm 218.1
5	3096 \pm 218.2	3010 \pm 196	2988 \pm 238.7	2976 \pm 204.6
6	3200 \pm 217.2	3086 \pm 194.2	3080 \pm 283.2	3058 \pm 217.3
7	3292 \pm 251.9	3196 \pm 228.6	3130 \pm 287.8	3146 \pm 247.6
8	3380 \pm 276	3301 \pm 269.9	3216 \pm 315.4	3198 \pm 272.5
9	3506 \pm 298	3400 \pm 288.2	3324 \pm 306.8	3246 \pm 360.7
10	3592 \pm 326	3523 \pm 274.9	3420 \pm 359.7	3346 \pm 438.3
11	3610 \pm 352.3	3553 \pm 298.6	3434 \pm 338.3	3358 \pm 402.6
12	3646 \pm 362.7	3589 \pm 325	3468 \pm 346	3392 \pm 433.6
13	3740 \pm 373.8	3655 \pm 325.4	3540 \pm 382.1	3456 \pm 420.8
14	3798 \pm 394.3	3710 \pm 340.1	3582 \pm 414.3	3510 \pm 418.1
15	3874 \pm 439.7	3788 \pm 351.4	3688 \pm 461.9	3574 \pm 394.2
16	3956 \pm 443	3833 \pm 349.7	3698 \pm 486.2	3599 \pm 403.7

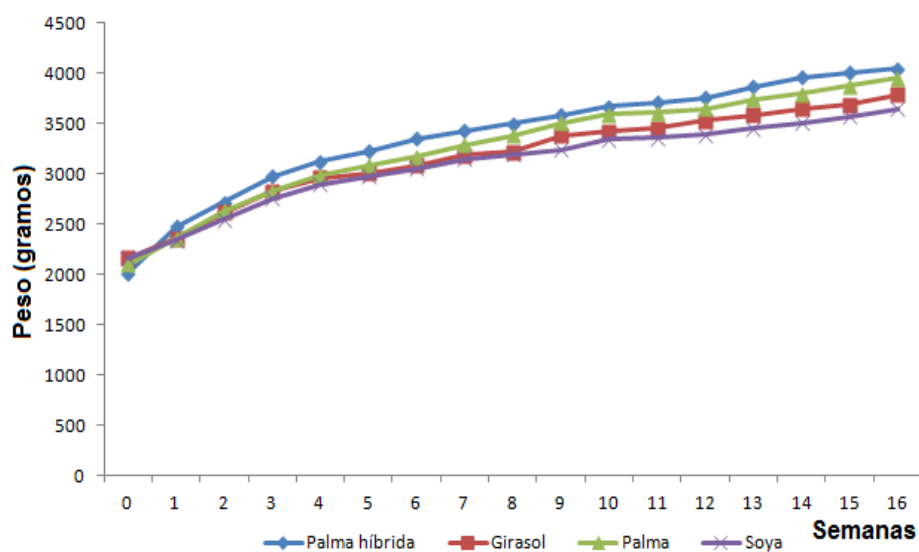


Figura 31: Evolución de los pesos de los animales de experimentación por grupo de tratamiento

5.2.2.1. Perfil lipídico

- **Valores iniciales**

Para analizar la comparabilidad de los grupos de tratamiento resultantes de la aleatorización al inicio del estudio se ajustó un modelo de análisis de la varianza de clasificación simple; el ajuste de este modelo se realizó mediante técnicas bayesianas partiendo de priors no informativos para la distribución del efecto de cada uno de los aceites considerados. La Figura 32 presenta la distribución a posteriori del valor medio –efecto– de cada uno de los aceites, así como la estimación de la variación dentro de tratamientos.

Como puede observarse en la parte A de la Figura 32, los cuatro grupos de tratamiento presentaron homogeneidad al inicio del estudio en cada una de las variables. Esta homogeneidad se caracterizó por algunas ligeras discrepancias en los valores individuales en cada grupo de tratamiento, como se aprecia en el recorrido intercuartílico de los diagramas de cajas que representan la distribución a posteriori de los valores de las variables en cada uno de los grupos de tratamiento.

En cuanto a la variabilidad (parte B de la Figura 32), se encontró que ésta era relativamente alta, lo cual es propio de las diferencias biológicas presentes entre los conejos que, aun cuando fueron controlados por raza, tienen la diferencia propia de su componente genético.

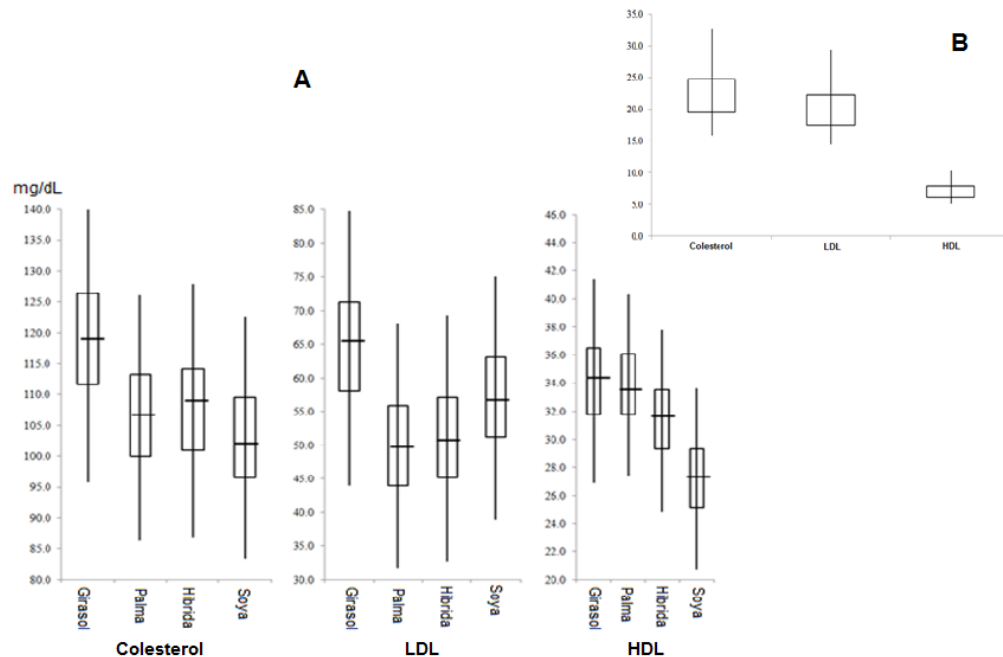


Figura 32: Distribución a posteriori de la media (A) y variabilidad (B) del perfil lipídico al inicio del estudio

- **Valores de los parámetros a lo largo del ensayo.**

Las dietas se suministraron a los conejos durante 4 meses y al cabo de cada uno de ellos los conejos fueron sangrados y se determinaron los parámetros lipídicos como se explica en la metodología. En la Tabla 17 y la Figura 33 muestran la media del colesterol total, LDLc y HDLc de cada grupo de conejos que consumió la dieta indicada. Para efectos de esta tesis, hemos llamado momentos a las determinaciones que se hicieron en los diferentes meses y se asignó el momento 1 a la determinación inicial en la semana 0 del ensayo.

Tabla 17: Media de los valores de perfil lipídico al inicio y final del ensayo para cada uno de los tratamientos

TRATAMIENTO	Conejo	COLESTEROL					LDLc					HDLc				
		Momentos														
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		mg/dL														
Palma	1	114	133	159	160	175	72	75	84	91	105	32	41	43	44	40
	2	95	98	107	122	130	45	43	49	58	60	26	27	32	35	33
	3	97	128	131	164	199	38	51	63	87	114	32	37	33	39	36
	4	129	142	163	162	170	57	71	83	80	82	45	41	43	42	46
	5	104	108	125	132	140	40	45	49	71	78	35	41	33	34	37
	Media	107,8	121,8	137	148	162,8	50,4	57	65,6	77,4	87,8	34	37,4	36,8	38,8	38,4
DE	13,99	18,23	23,66	19,54	27,87	14,15	14,97	17,31	13,24	21,71	6,96	6,07	5,67	4,32	4,93	
Palma Híbrida	6	123	118	173	175	171	67	55	95	109	115	33	34	38	31	43
	7	85	131	125	138	125	35	60	64	51	62	26	32	35	36	38
	8	101	114	125	125	139	49	55	52	60	65	30	32	34	38	41
	9	134	168	125	170	171	64	103	100	91	99	33	37	41	39	42
	10	101	12	132	159	175	43	59	67	92	107	35	34	35	36	43
	Media	108,8	108,6	136	153,4	156,2	51,6	66,4	75,6	80,6	89,6	31,4	33,8	36,6	36	41,4
DE	19,52	58,05	20,90	21,31	22,70	13,67	20,59	20,84	24,21	24,51	3,51	2,05	2,88	3,08	2,07	
Soya	11	89	175	195	199	185	45	132	108	122	150	16	30	29	16	12
	12	130	255	297	300	293	90	231	240	242	245	29	19	14	15	20
	13	83	105	120	128	133	30	32	54	57	72	39	44	38	30	22
	14	110	160	154	160	149	63	90	100	95	108	25	34	24	29	24
	15	109	135	136	148	146	60	65	62	89	99	27	27	23	20	24
	Media	104,2	166	180,4	187	181,2	57,6	110	112,8	121	134,8	27,2	30,8	25,6	22	20,4
DE	18,73	56,39	70,93	68,27	65,41	22,39	76,87	74,84	71,48	67,67	8,26	9,20	8,79	7,11	4,98	
Girasol	16	105	135	169	172	179	55	135	157	150	155	27	29	25	22	22
	17	110	139	173	190	196	40	72	100	99	112	29	35	29	27	26
	18	127	154	182	215	203	79	120	150	145	164	36	40	35	32	30
	19	132	167	189	210	205	83	116	140	145	146	40	47	32	28	28
	20	130	177	192	220	215	69	109	115	100	120	39	38	29	26	19
	Media	120,8	154,4	181	201,4	199,6	65,2	110,4	132,4	127,8	139,4	34,2	37,8	30	27	25
DE	13,03	14,66	9,00	19,72	11,81	20,35	27,10	25,47	23,95	22,72	6,06	7,63	4,27	4,11	3,42	

Como se puede observar en la Figura 33, tanto el colesterol total como el LDLc siguen una misma tendencia, mostrando un aumento más marcado en los valores para los conejos que consumieron las dietas con girasol y soya que para los que consumieron palma y palma híbrida. Se observa claramente que los menores aumentos en estos dos parámetros se encontraron en la palma híbrida con valores del 43.6% y 73.6% para colesterol y LDLc respectivamente y los más altos para soya con 73.9% y 134% respectivamente.

Por el contrario, la tendencia de los valores observados en el parámetro HDLc muestran que éste disminuye en los tratamientos con soya y girasol y aumenta en los de palma y palma híbrida, así: soya y girasol muestran una disminución del 25% y 27% respectivamente mientras que palma y palma híbrida lo aumentan en 12.9% y 31.8%.

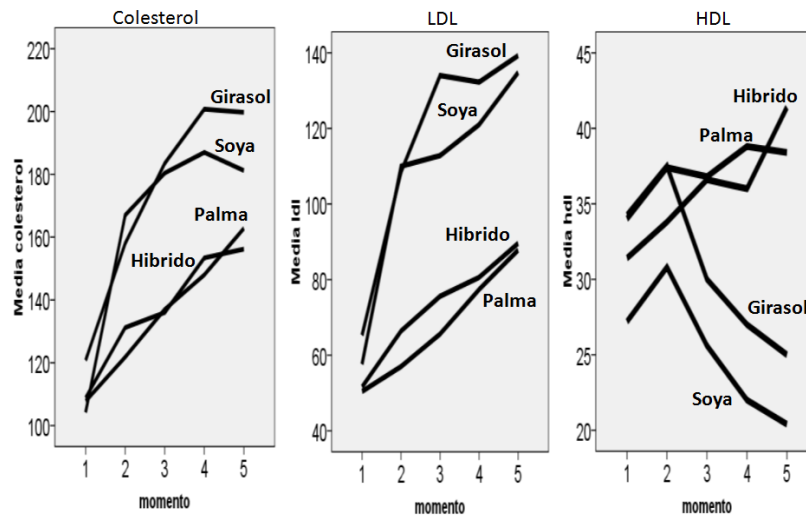


Figura 33: Media de las variables del perfil lipidico en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento

Una medida de la variabilidad biológica es la relevancia de las desviaciones estándar. En la Figura 34 se presentan las desviaciones estándar encontradas en cada uno de los momentos para cada variable del perfil lipídico.

Al analizar el comportamiento de estas desviaciones estándar se aprecia que el comportamiento es diferente para las dietas basadas en aceite de palma que mantuvieron una amplitud de la desviación relativamente pequeña, excepto en el parámetro HDLc de palmoleína que fue muy alto para los cuatro primeros momentos. Por el contrario los valores de las desviaciones estándar fueron bastante grande para las dietas con aceites poliinsaturados

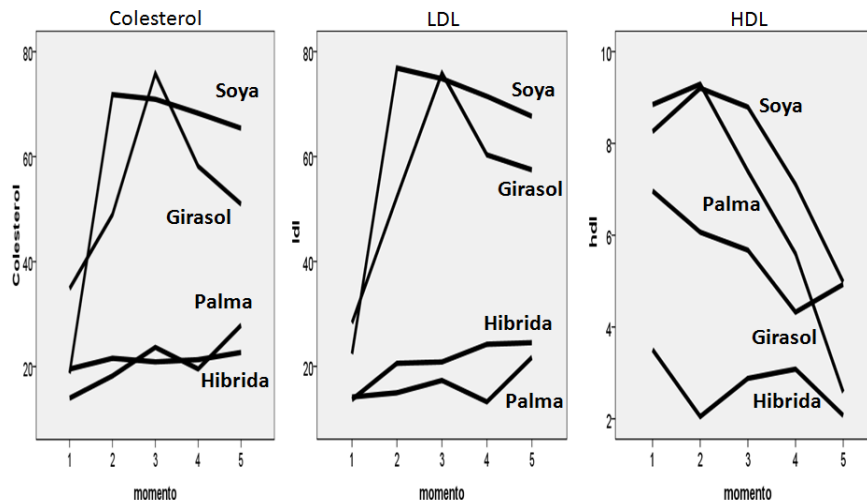


Figura 34: Desviación estándar del perfil lipidico en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento

- ***Modelo para controlar por el efecto de la variabilidad biológica.***

Para controlar el efecto de la variabilidad biológica de los conejos y aislar los efectos individuales de los diferentes factores que en este estudio influyeron sobre el perfil lipídico, se utilizó un modelo de efectos mezclados (fijos y aleatorios) para observaciones repetidas. Este modelo es común en los análisis estadísticos de este tipo de problemas; en él, el efecto del tipo de aceite se ajustó incorporando en el mismo los otros factores que pudieran influir sobre los valores del perfil lipídico, específicamente el efecto biológico de los conejos; este fue incorporado como un componente aleatorio como es usual en este tipo de modelación. El modelo fue ajustado utilizando técnicas bayesianas partiendo de priors no informativos. El anexo 13 muestra el modelo considerado, sus componentes y las instrucciones utilizadas para la obtención de las distribuciones a posteriori del efecto de los componentes modelo.

Para el análisis del efecto de los tratamientos se tomó la dieta con aceite de girasol como el tratamiento de referencia porque la dieta que usó este aceite contiene cantidades muy pequeñas de tocotrienoles.

Las Figuras 35 y 36 muestran la distribución a posteriori de la diferencia entre los efectos de cada uno de los tratamientos con el aceite de referencia a los cuatro meses de ingesta de las dietas.

De acuerdo con este modelo, es claro que el tratamiento con aceite de soya se comporta de manera semejante al tratamiento de referencia. Por el contrario, como se puede observar, el tratamiento con palmoleína y palmoleína híbrida claramente redujo el valor del colesterol total y LDLc con una certidumbre superior a 85% de que el efecto es real. De la misma manera, los tratamientos con palmoleína incrementan en forma real el HDLc con una certidumbre superior a 95%.

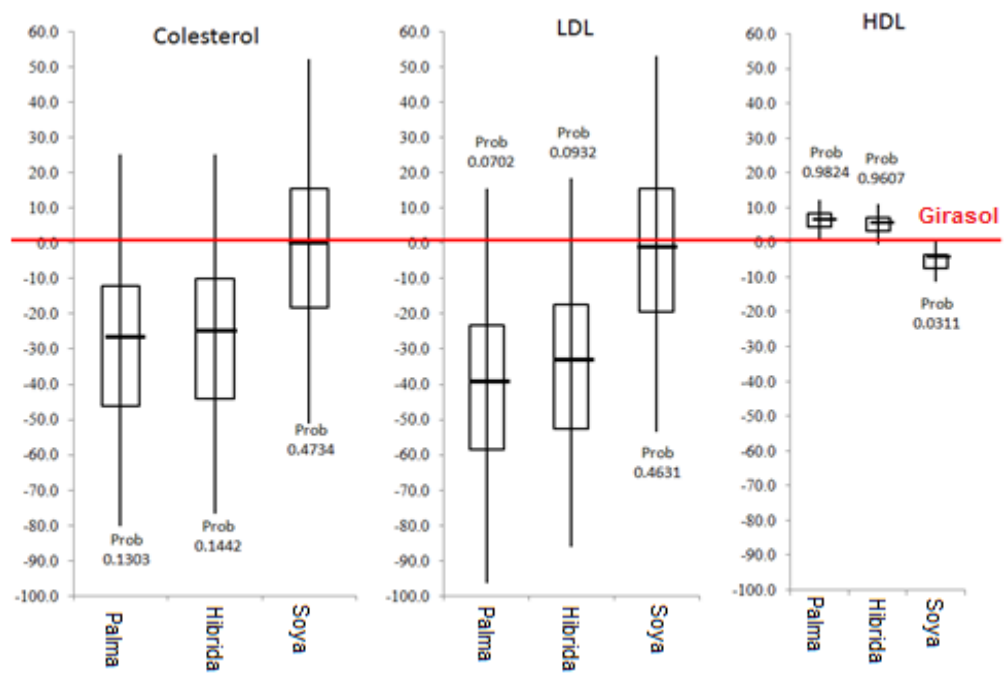


Figura 35: Distribución a posteriori del efecto de los tratamientos sobre el perfil lipídico, en relación con el efecto del aceite de girasol

Con el objeto de observar el efecto acumulativo de la ingesta de grasas sobre el perfil lipídico de los conejos, se estimaron los aportes de los momentos en que se hizo la medición sobre el colesterol total, las LDL y las HDL, este aporte se determinó en el modelo de efectos mezclados aislando el efecto específico del momento sobre la medición al separarlo del efecto del tipo de aceite. La Figura 36 presenta los efectos del momento en que se hizo la medición al perfil lipídico, estos efectos fueron considerados en relación al momento inicial del estudio.

Como se puede apreciar la acumulación de exposición a las grasas, independientemente de su tipo produce un incremento gradual del Colesterol y del LDLc, así como una disminución de las HDL. El gráfico permite afirmar que existe una proporcionalidad directa entre el tiempo de exposición y los incrementos en el Colesterol y el LDLc, en el caso del HDL se presentó una proporcionalidad inversa aunque esta no fue tan marcada pues se alcanzó una cierta meseta en los efectos a partir de las 12 semanas de tratamiento

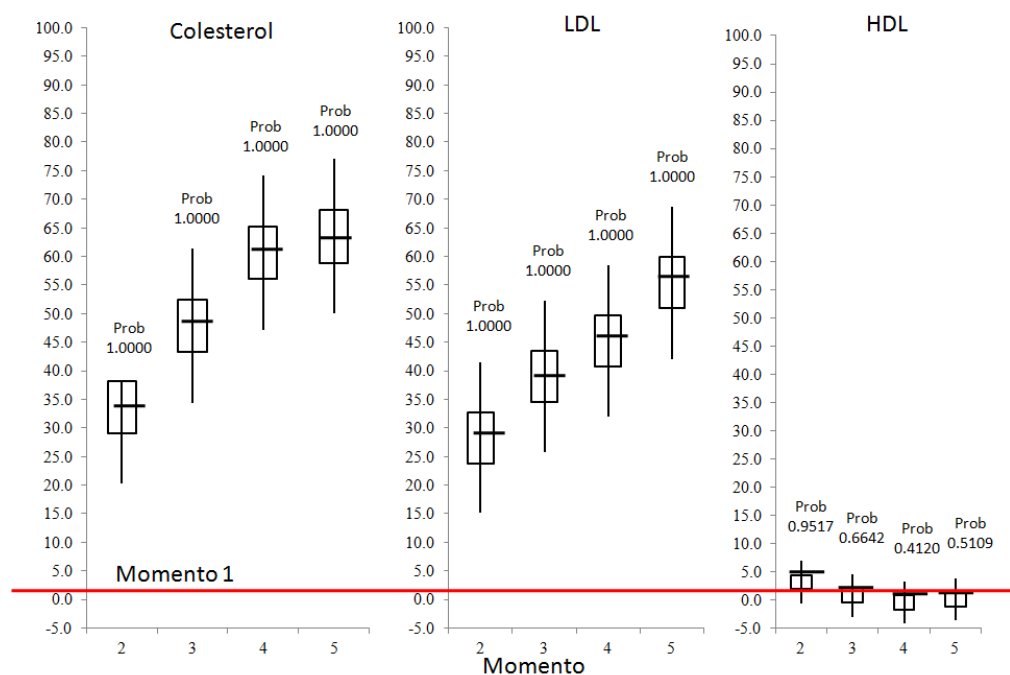


Figura 36: Distribución a posteriori del efecto del momento de la evaluación sobre las variables del perfil lipídico

5.2.2.2. Porcentaje relativo de los ácidos grasos saturados e insaturados en las lipoproteínas del plasma.

Con el objeto de observar si el componente graso principal de las dietas influía en el porcentaje relativo de los ácidos grasos de las lipoproteínas del plasma, se determinó el porcentaje relativo de ácidos grasos en el plasma de los conejos en el momento 1 y el momento 5 del ensayo. En la Tabla 18 aparece la sumatoria de los porcentajes relativos de ácidos grasos saturados e insaturados de la fracción lipídica del plasma. Los datos brutos para cada conejo aparecen en el Anexo 15.

Como se puede observar en la Tabla 18, al final del tratamiento se presentó una pequeña variabilidad en la concentración de los ácidos grasos a nivel plasmático, cambios que fueron más notorios en el grupo alimentado con aceite de girasol, en el cual se presentó una disminución en los ácidos grasos saturados del 24.18% y un aumento en los insaturados del 16.6%. Igualmente los otros tres grupos presentaron la misma tendencia pero con cambios menores: palma con una disminución en la concentración de saturados del 0.14% y aumento de insaturados de 2%, palma híbrida con una disminución de saturados del 7.28% y aumento de insaturados del 9% y soya con una disminución de saturados del 3.41% y aumento de insaturados del 5%.

Tabla 18: AGS vs AGI al inicio y final del ensayo 1.

Tratamiento	Característica	INICIAL		FINAL	
		SATURADOS	INSATURADOS	SATURADOS	INSATURADOS
		Porcentaje relativo			
Palma	Media	41,48	55,00	41,42	56,10
	DE	2,94	4,66	1,89	3,31
Palma Híbrida	Media	38,18	57,30	35,40	62,48
	DE	2,64	3,91	3,20	1,82
Soya	Media	34,29	62,15	33,12	65,26
	DE	2,79	3,48	2,09	3,63
Girasol	Media	40,64	56,24	30,81	65,60
	DE	3,75	3,44	3,51	2,65

5.2.2.3. Concentración de Vitamina E en plasma

Al analizar los resultados presentados en la Tabla 19, se observa un aumento en las concentraciones plasmáticas de TF en todos los grupos, con una variación entre el 63% para el tratamiento con girasol y del 123.92% para el tratamiento con soya. Por el contrario, en cuanto a las concentraciones plasmáticas de T3E, se observa que éstas disminuyeron en los tratamientos con soya y girasol (44.81% y 24.28%, respectivamente) y aumentaron en los tratamientos con palma y palma híbrida (84.78% y 61.98%, respectivamente), como es de esperar de acuerdo con el metabolismo diferenciado de tocoferoles y tocotrienoles.

Tabla 19: Concentración Vitamina E al inicio y final del tratamiento

Tratamiento	Característica	INICIAL		FINAL	
		Tocoferoles	Tocotrienoles	Tocoferoles	Tocotrienoles
Palma	Media	4,609	1,964	8,198	3,629
	DE	0,686	0,174	0,869	0,673
Palma Híbrida	Media	5,475	2,378	10,367	3,852
	DE	0,860	0,260	0,762	0,393
Soya	Media	7,336	2,323	16,427	1,282
	DE	0,798	0,078	1,347	0,339
Girasol	Media	6,482	2,479	10,566	1,877
	DE	0,736	0,422	0,778	0,590

5.2.2.4. Función endotelial

Uno de los efectos esperados de la ingesta de tocotrienoles tiene que ver con sus diferentes acciones sobre el endotelio. Todas estas acciones de alguna manera se conjugan para permitir que haya una mayor o menor relajación de las arterias en presencia de agentes como la acetil colina o la nitroglicerina. El efecto de la acetil colina es mediado por la producción de NO, mientras que la nitroglicerina actúa directamente sobre las células de músculo liso. Como se describe en métodos, anillos de aorta abdominal de los conejos se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de relajación al incubarlos con diferentes concentraciones de acetil colina o de nitroglicerina.

En la Figura 37 se observa que el porcentaje de relajación de las arterias se incrementa con la dosis de acetil colina, como es de esperar en un ensayo dosis-respuesta. Este incremento es aproximadamente lineal. Los resultados muestran que el consumo de una dieta con aceite de soya o palmoleína híbrida resulta en arterias que responden mejor a la acetil colina que aquellas provenientes de conejos alimentados con dietas con aceite de girasol o palmoleína. A diferencia de lo encontrado con acetil colina, la incubación con nitroglicerina (Figura 38), cuyo efecto no es mediado por NO sino que actúa directamente sobre las células de músculo liso de la media, fue similar en los cuatro tipos de dieta.

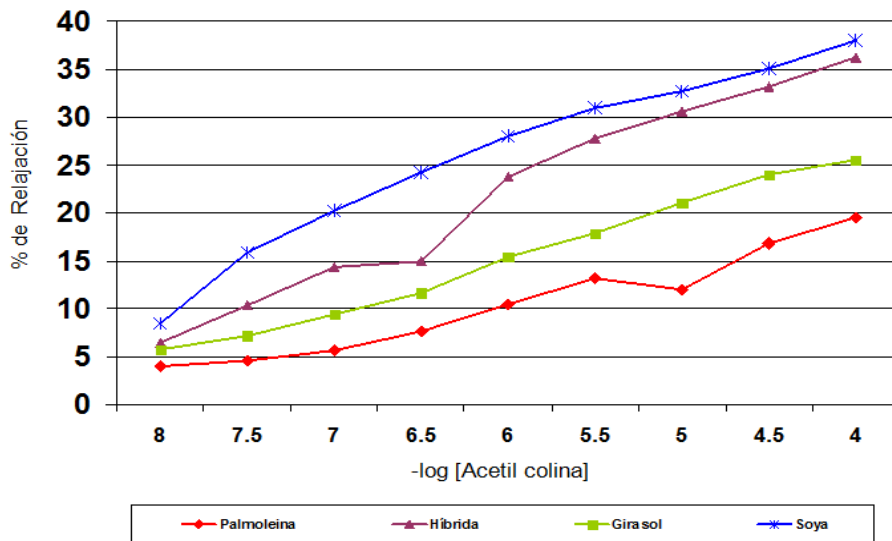


Figura 37: % relajación con ACH

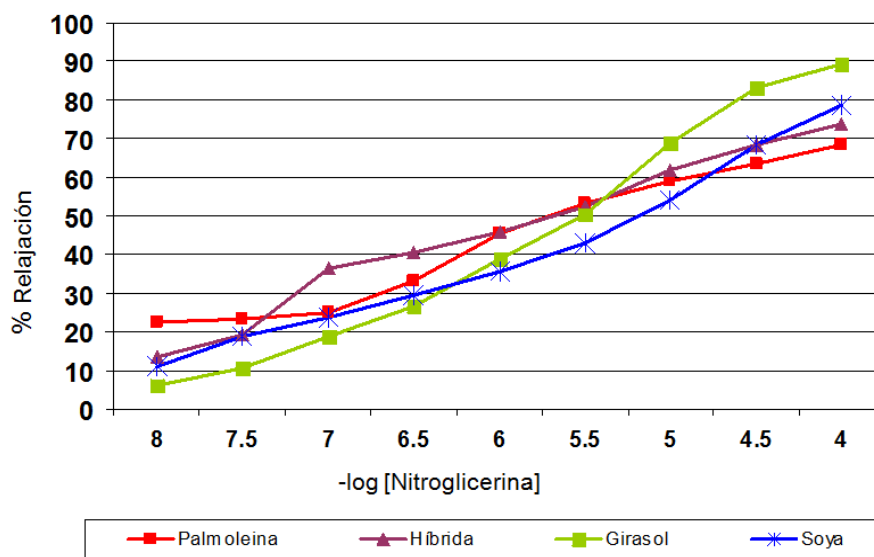


Figura 38: % relajación con Nitroglicerina

5.2.2.5. Formación de placa ateromatosa

Como se puede observar en la Tabla 20, ningún conejo presentó formación de placa ateromatosa al término de 4 meses de consumo de las dietas, todas las cuales contenían una cantidad de colesterol equivalente a una dieta corriente, con inclusión un huevo diario, consumida por la población colombiana.

Tabla 20: Placa ateromatosa

	CONEJO No.	AREA VASO mm ²	AREA LUMEN mm ²	AREA DE LA MEDIA mm ²	DIAMETRO 1 mm	DIAMETRO 2 mm	PROMEDIO DIAMETRO mm	AREA PLACA mm ²	GROSOR MAX NEOINTIMA mm
Palma	1	10.38	9.33	1.05	2.87	4.22	3.545	0	0
	2	12.84	10.41	2.43	4.39	3.15	3.77	0	0
	3	12.9	11.04	1.86	4.47	3.13	3.8	0	0
	4	13.06	10.78	2.28	4.82	2.58	3.7	0	0
	5	8.67	7.15	1.52	3.28	2.76	3.02	0	0
	6	6.24	5.24	1	3.14	2.1	2.62	0	0
Híbrida	7	10.94	9.31	1.63	4.16	2.72	3.44	0	0
	8	8.39	6.7	1.69	3.14	2.78	2.96	0	0
	9	8.14	6.42	1.72	3.87	2.19	3.03	0	0
	10	9.24	7.25	1.99	4.69	1.88	3.285	0	0
	11	5.6	4.07	1.53	3.47	1.27	2.37	0	0
Soya	12	7.91	5.98	1.93	3.17	2.5	2.835	0	0
	13	9.1	6.73	2.37	5.41	1.38	3.395	0	0
	14	9.29	7.46	1.83	3.41	2.69	3.05	0	0
	15	10.16	8.32	1.84	3.33	3.42	3.375	0	0
	16	6.56	5.53	1.03	2.96	2.27	2.615	0	0
Girasol	17	9.34	7.48	1.86	4.49	2	3.245	0	0
	18	7.61	6.07	1.54	3.15	2.31	2.73	0	0
	19	9.66	8.19	1.47	3.75	2.8	3.275	0	0
	20	9.02	7.47	1.55	3.49	2.33	2.91	0.19	0.09

5.2.3. Ensayo 2

El objetivo de este ensayo fue comparar el efecto de la presencia de tocotrienoles de la dieta utilizando como vehículo el aceite de palma común y la harina de trigo sobre el perfil lipídico y la capacidad oxidativa de las LDL en dietas con y sin colesterol adicionado.

Como se puede observar en la Figura 39 y la Tabla 21, los ocho grupos fueron homogéneos en cuanto al peso durante todo el ensayo. En cuanto al consumo este tuvo un valor promedio de 150 g/d con un mínimo de 145.8 y un máximo de 152.7.

Tabla 21: Descripción de los peso en gramos durante los cuatro meses de tratamiento

Semana	Oliva	Oliva + Col	Palma	Palma + Col	Oliva + Trigo	Oliva + trigo + Col	Palma + Trigo	Palma + Trigo + Col
	Media \pm D.S.							
0	2100 \pm 173.5	2175 \pm 226.4	2210 \pm 272.6	2248 \pm 249.3	2220 \pm 240	2267 \pm 268.5	2215 \pm 200.4	2195 \pm 243.5
2	2525 \pm 114.4	2430 \pm 319.9	2500 \pm 289.6	2572 \pm 229.3	2555 \pm 238.9	2573 \pm 230.5	2460 \pm 223.4	2550 \pm 203.4
4	2875 \pm 121.7	2755 \pm 410.6	2875 \pm 302.8	2758 \pm 227.9	2845 \pm 245.2	2883 \pm 191.9	2825 \pm 242.7	2860 \pm 210.2
6	3000 \pm 173.9	2910 \pm 347.9	3035 \pm 330.9	2938 \pm 219.9	3005 \pm 224.5	3173 \pm 183.5	3010 \pm 242.4	2980 \pm 256.3
8	3300 \pm 178.9	3175 \pm 339.5	3210 \pm 272.6	3183 \pm 162.9	3200 \pm 224.8	3388 \pm 140.1	3250 \pm 238.3	3170 \pm 280.1
10	3500 \pm 138.5	3580 \pm 320.5	3443 \pm 395.5	3407 \pm 146.7	3485 \pm 199	3590 \pm 151.5	3490 \pm 216.4	3510 \pm 320.2
12	23675 \pm 188.9	3790 \pm 291.4	3710 \pm 301	3712 \pm 237.5	3710 \pm 198.3	3755 \pm 151.7	3680 \pm 230.6	3720 \pm 282.8
14	3875 \pm 148.6	3947 \pm 269.4	3938 \pm 281.2	3852 \pm 256.2	3885 \pm 292.6	3880 \pm 191	3825 \pm 219.5	3865 \pm 242.2
16	3975 \pm 212.4	4035 \pm 292.3	4100 \pm 243.8	3965 \pm 248.7	4045 \pm 213	4055 \pm 176.3	3985 \pm 233.4	3980 \pm 246.9

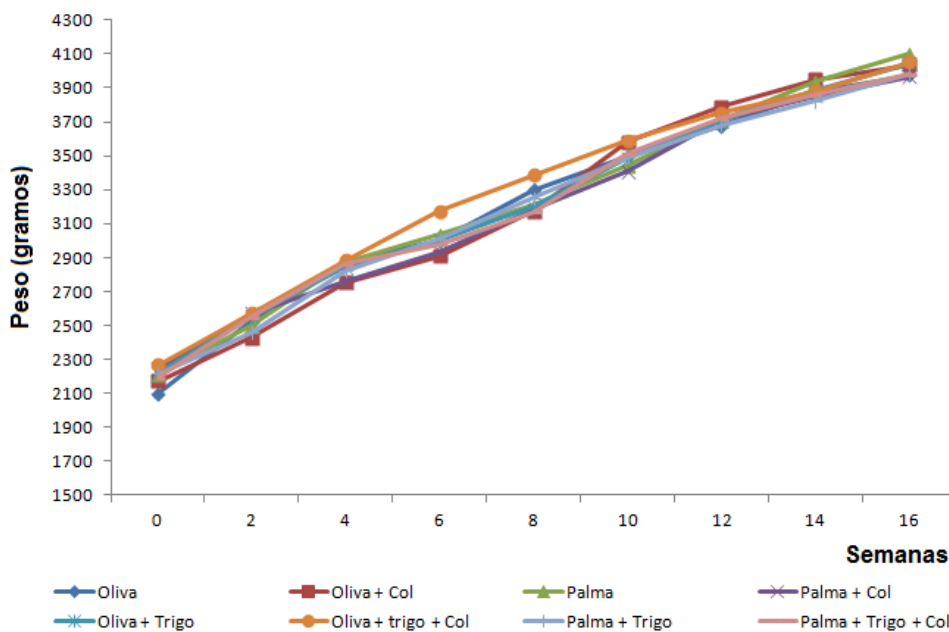


Figura 39: Progresión de pesos en los diferentes grupos de tratamiento

5.2.3.1. Perfil lipídico:

Inicialmente se compararon los valores iniciales de perfil lipídico en el momento 1, en los diferentes grupos a los que fueron aleatorizados los conejos

- **Valores iniciales**

Como puede apreciarse en la Figura 40, los diferentes grupos presentaron homogeneidad al inicio del estudio en cada una de las variables. Esta homogeneidad se caracterizó por algunas ligeras discrepancias en los valores individuales en cada grupo de tratamiento, como se aprecia en el recorrido intercuartílico de los diagramas que representan la distribución de los valores de las variables en cada uno de los grupos de tratamiento

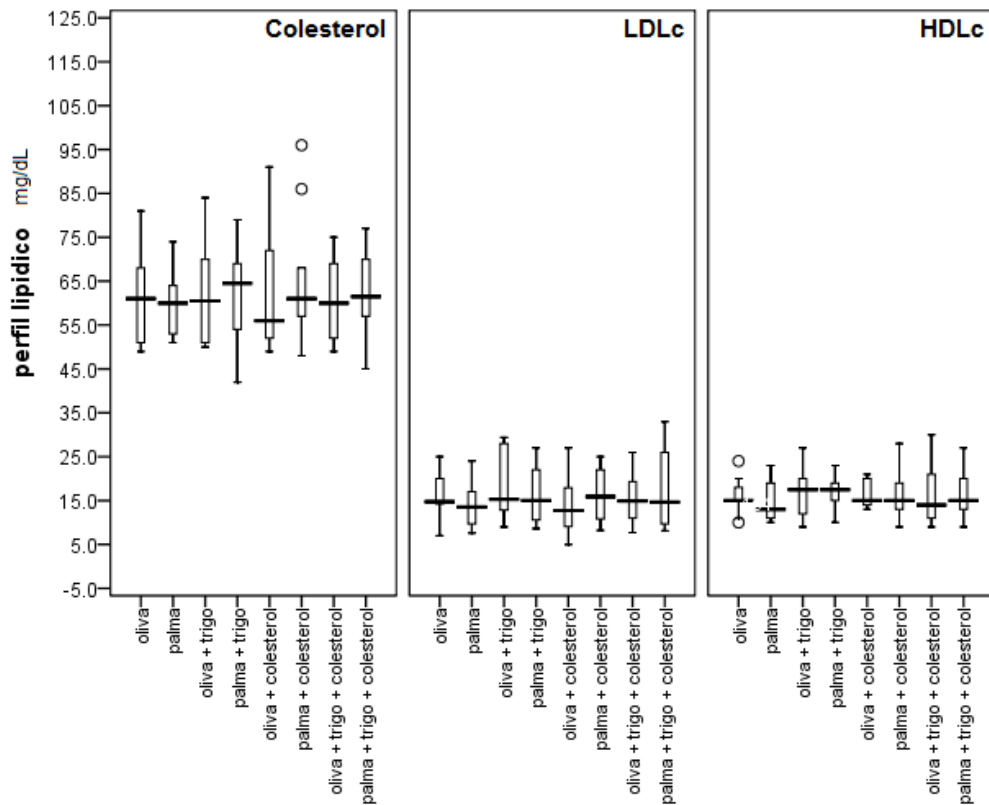


Figura 40: Valores iniciales del perfil lipídico según grupo de tratamiento

La Tabla 22 permite complementar el análisis de homogeneidad inicial. En ella se puede apreciar que al comparar los intervalos de credibilidad bayesianos construidos con una certidumbre del 95%, es posible afirmar que, en promedio, todos los grupos eran

semejantes en el momento inicial del estudio. Las diferencias de las desviaciones estándar entre grupos no fueron considerables pero la diferencia de los valores intragrupo fue relativamente alta, como lo manifiestan valores entre 42 y 96 mg/dL para el Colesterol Total, 5 y 30 mg/dL para el LDL y 9 y 33 mg/dL para el HDL.

Tabla 22: Perfil lipídico inicial cada grupo de tratamiento

Perfil lipídico	Característica	Oliva	Palma	Oliva + Trigo	Palma + trigo	Oliva + Colesterol	Palma + Colesterol	Oliva + Trigo + Colesterol	Palma + Trigo + Colesterol
Colesterol	n	10	10	10	10	10	9	10	10
	Media (DE)*	61.4 (10.6)	60.5 (10.6)	62.5 (11.7)	61.2 (12.2)	63.4 (15.2)	65.4 (16.1)	60.9 (9.4)	62.4 (9.2)
	Min	49	51	50	42	49	48	49	45
	Max	81	74	84	79	91	96	75	77
	Intervalo de credibilidad	53.5 69.2	54.9 66	53.8 71.2	52.1 70.2	52.1 74.7	52.3 78.5	53.9 67.8	55.6 69.2
LDL	n	10	10	10	10	10	9	10	10
	Media (DE)*	16.1 (5.6)	13.7 (5.1)	18.5 (8.0)	16.4 (7.0)	13.8 (6.7)	15.7 (6.1)	15.9 (6.3)	17.1 (9.9)
	Min	7	7.6	9	8.6	5	8.2	7.7	8.1
	Max	25	24	29.4	11.1	8.8	10.7	11.2	9.7
	Intervalo de credibilidad	11.9 20.3	9.9 17.5	12.5 24.4	11.1 21.6	8.8 18.7	10.7 20.7	11.2 20.6	9.7 24.5
HDL	n	10	10	10	10	10	9	10	10
	Media (DE)*	15.8 (4.1)	15.1 (4.7)	17.0 (5.4)	16.6 (3.7)	16.0 (3.4)	16.0 (5.7)	16.4 (6.8)	16.0 (5.3)
	Min	10	10	9	10	13	9	9	9
	Max	24	23	27	23	21	28	30	27
	Intervalo de credibilidad	12.8 18.8	11.6 18.6	13.0 21.0	13.8 19.4	14.1 19.1	11.3 20.6	11.3 21.5	12.1 19.9

* (DE) = Desviación estándar

• **Efecto de la Presencia de tocotrienoles en la dieta sobre el perfil lipídico.**

Como se describió en la metodología, cada grupo de conejos consumió una dieta determinada durante cuatro meses y fueron sangrados una vez por mes, incluyendo el mes cero. Se escogió la dieta de aceite de oliva como dieta de referencia ya que tiene una concentración de ácido oleico similar a la del aceite de palma, pero no contiene tocotrienoles y su concentración de ácidos grasos saturados es bastante menor que la de palmoleína. De esta manera, los dos tipos de dieta se diferencian en la relación AGS/AGI y presencia de tocotrienoles. Para diferenciar el posible efecto de los tocotrienoles naturales de otros posibles componentes presentes en cualquiera de los dos aceites, a cada una de las dietas se le adicionó harina de trigo integral como fuente de tocotrienoles. Toda vez que la adición de colesterol a dietas para conejo incrementa el colesterol plasmático con el tiempo, a las cuatro dietas básicas arriba señaladas se les adicionó 0,1% de colesterol.

Como se puede observar en la Tabla 23 y Figura 41, la dieta con aceite de oliva resultó en una disminución de 11.7% en el colesterol total; 8.7% en LDLc y 7% en HDLc. Se debe

resaltar que esta dieta disminuye los valores de HDLc. En el caso de la dieta con palmoleína se encontró que hubo una disminución no relevante del colesterol total y del LDLc y un aumento del 21.2% del HDLc. Al añadir como fuente de tocotrienoles harina de trigo integral, se observó que se potenció el efecto anterior. Así, el colesterol total de los conejos que consumieron la dieta de aceite de oliva + harina de trigo integral, disminuyó en un 26.9%, es decir, un 15.2% adicional. En el caso de los conejos que consumieron palma + harina, la disminución fue de 15.8%, similar al decremento adicional obtenido con la dieta de aceite de oliva + harina. Si analizamos el efecto sobre el LDLc la disminución con la dieta oliva + harina fue de 25.4%, es decir, un 17% adicional, pero más interesante aún se reversa la disminución del valor de HDLc y se observó en cambio, un incremento del 16%. El efecto es también claro en el caso de los conejos que consumieron la dieta de palmoleína + harina en cuyo caso, el LDLc disminuyó un 21% y hubo un incremento adicional del 7% en HDLc. Estas cifras muestran que la adición de tocotrienoles naturales en la forma de harina de trigo potenció el efecto hipocolesterolemizante del aceite de oliva y cambió el efecto del aceite sobre las HDLc que pasó de disminuir, a aumentar con la adición de la harina. Muestran, también, que los tocotrienoles de la harina de trigo potenciaron el incremento de HDLc en los conejos que consumieron palmoleína y disminuyeron tanto el colesterol total como el LDLc.

Este mismo efecto se pudo observar cuando los conejos consumieron una dieta a la que se le adicionó 0,1% de colesterol. Como era de esperarse, el colesterol total se incrementó en todos los conejos a lo largo del tiempo, pero el valor final parece depender de la presencia o no de tocotrienoles. En efecto, el colesterol plasmático de los conejos que consumieron la dieta con aceite de oliva se incrementó un 64.51% (63.4 a 104.3 mg/dL), pero cuando se le adicionó harina de trigo, el aumento fue de solo 46.2% (60.9 a 89.1 mg/dL). Este incremento se refleja, como es de esperar, en los valores de LDLc que subieron a 66.7%, pero en presencia de harina de trigo este incremento fue de sólo 48.4% cifra similar a la de colesterol total. Es llamativo que los conejos que consumieron la dieta con aceite de oliva + colesterol incrementaron su HDLc, contrario a lo que sucedió con los que consumieron la dieta con aceite de oliva sin adiciones. El añadir harina de trigo no afectó el incremento en HDLc, lo que sugiere que en este caso hay otros factores diferentes a los tocotrienoles que influyen sobre el HDLc. Los valores de los parámetros en la sangre de conejos que consumieron aceite de palma más colesterol muestran una tendencia similar en el sentido de que al final del experimento se incrementó el colesterol total y el LDLc. Sin embargo, el incremento fue bastante menor que en el caso de la dieta con aceite de oliva, y representó sólo el 32.2% en contraste con el 64.5% de la dieta con aceite de oliva. El LDLc se incrementó en 43.9% mientras que el HDLc aumentó un 23%. El menor incremento en colesterol total se puede atribuir a la presencia de tocotrienoles en el aceite de palma y esto se confirma al observar los resultados cuando se añade harina de trigo a esa misma dieta. En este caso, el incremento de colesterol total fue de 29%, de LDLc de 26.9% y de HDLc fue 29.4%. Nótese que el efecto no fue tan grande como se esperaría al observar los datos con el aceite de oliva que muestran una disminución porcentual mayor en el incremento al añadir la harina de trigo.

Tabla 23: Media de los valores de perfil lipídico al inicio y final del ensayo para cada uno de los tratamientos

Tratamiento	Colesterol		LDLc		HDLc	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
	mg/dL					
Oliva	61.4	54.2	16.1	14.7	15.8	14.7
Palma	60.5	59.9	13.7	13.4	15.1	18.3
Oliva + Trigo	62.5	45.7	18.5	13.8	17.0	19.8
Palma + Trigo	61.2	51.5	16.4	13.0	16.6	21.3
Oliva + Colesterol	63.4	104.3	13.8	23.0	16.6	20.2
Palma + Colesterol	65.4	86.5	15.7	22.6	16.0	19.9
Oliva + Colesterol + Trigo	60.9	89.1	15.9	23.6	16.4	20.6
Palma + Colesterol + Trigo	62.4	80.0	17.1	21.7	16.0	20.7

En el Anexo 16 se presentan las medias y desviaciones estándar de estos parámetros en los cinco momentos del experimento. A partir de esos valores se construyeron las gráficas que se presentan en la Figura 41, en las que se observa la tendencia temporal de cada uno de dichos parámetros.

Como se puede observar en el comportamiento de los datos con el tiempo, se presentaron incrementos aproximadamente lineales, esta linealidad determinó dos patrones de comportamiento para la tendencia del cambio del colesterol en los diferentes momentos en que fue evaluado durante el experimento. En el caso de los tratamientos con colesterol añadido se apreció una tendencia a incrementar los valores del colesterol, tendencia que se presentó con diferentes valores de incremento, mientras que en los otros casos la tendencia fue a la disminución de nuevo con diferentes valores del decrecimiento (velocidad de decrecimiento).

Si se analizan los tratamientos sin colesterol, se observa que todos disminuyeron los niveles de colesterol total pero que al adicionarles trigo se logró una mayor disminución de estos niveles, siendo así que el tratamiento con oliva mostró una disminución del 11.7% (61.4 a 54.2 mg/dL) al final del ensayo, pero cuando a éste se le adicionó trigo, la disminución fue de 26.9% (62.5 a 45.7 mg/dL). En el caso del tratamiento con palma se observa la misma tendencia, pasando de una disminución del 1% (60.5 a 59.9 mg/dL) a 15.8% (61.2 a 51.5 mg/dL) cuando se le adicionó una fuente adicional de tocotrienoles.

En cuanto a las dietas con adición de colesterol, se observa que todas causaron un aumento en los niveles plasmáticos de colesterol total, pero que aquellas que tenían trigo adicionado produjeron un menor incremento, siendo así que el tratamiento de oliva con colesterol produjo un aumento de 64.5% (63.4 a 104.3 mg/dL) mientras que la misma dieta con adición de trigo causó un aumento de 46.3% (60.9 a 89.1 mg/dL). Es importante resaltar que aun cuando los tratamientos con palma y colesterol también produjeron aumento en los niveles plasmáticos de colesterol, este incremento fue menor que el observado en los tratamientos con oliva y colesterol, siendo así que el tratamiento con palma y colesterol produjo un incremento de los valores de colesterol total del 32.3% (65.4 a 86.5 mg/dL) y cuando a este tratamiento se le incluyó una fuente adicional de tocotrienoles, el trigo, el incremento fue de 28.2% (62.4 a 80.0 mg/dL).

Es importante resaltar que en el tratamiento palma + colesterol, aun cuando se observó que el efecto sobre los niveles de colesterol total siguió una tendencia lineal de crecimiento, al final de la semana 12 de tratamiento se presentó un aplanamiento en el incremento de los valores, llegando a un valor final de 86.5 mg/dL. En caso de que este aplanamiento no se hubiera presentado, el valor final hubiera sido de aproximadamente 92.5 mg/dL, el cual de todas formas hubiera sido menor que el del tratamiento con oliva + colesterol.

Al analizar el comportamiento de las desviaciones estándar (parte B de la Figura 41), se apreció que durante todo el experimento se mantuvieron o incrementaron los niveles de variabilidad observados al inicio; esta ligera heterogeneidad es propia de las diferencias biológicas entre conejos.

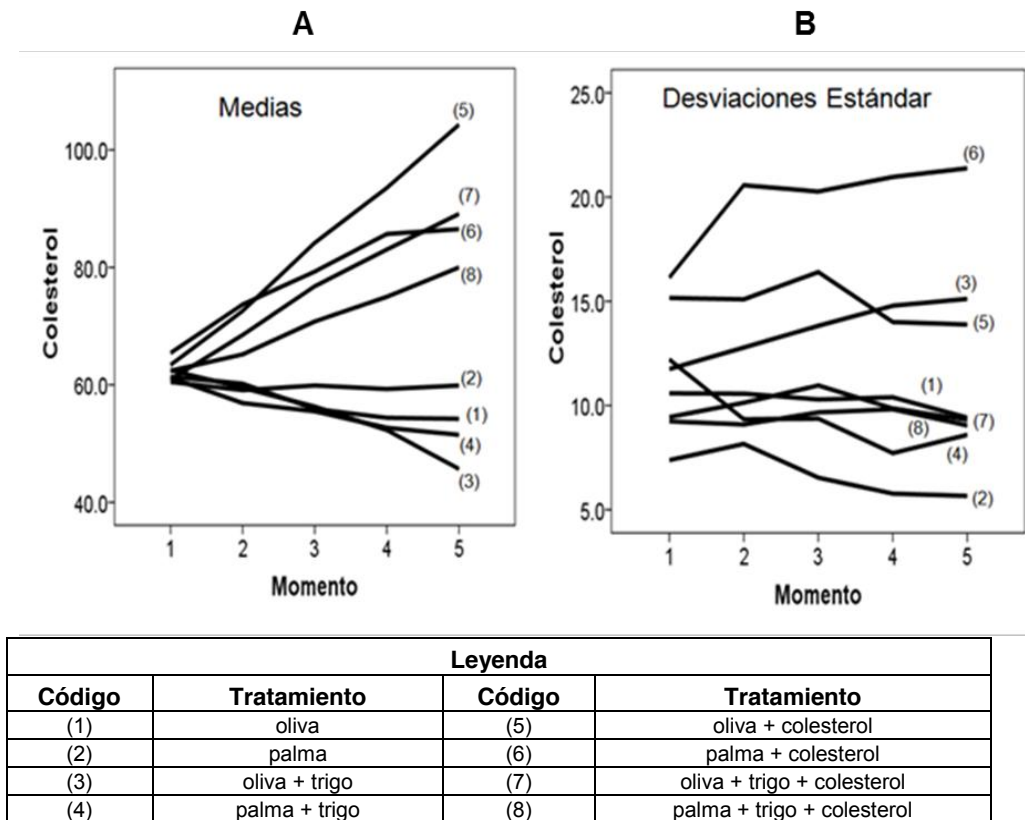


Figura 41: Colesterol Media y Desviación estándar en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento

Como se puede observar en la parte A de la Figura 42, el comportamiento tanto de los tratamientos con colesterol adicionado como de aquellos con adición de trigo fue similar al presentado en el parámetro colesterol total.

Si se analizan los tratamientos sin colesterol, se observó que al adicionarles trigo se logró una mayor disminución de los niveles plasmáticos de LDL, siendo así que el tratamiento con oliva mostró una disminución del 8.4% (16.1 a 14.7 mg/dL) al final del ensayo, pero

cuando a éste se le adicionó trigo, la disminución fue de 25.1% (18.5 a 13.8 mg/dL). En el caso del tratamiento con palma se observa la misma tendencia, pasando de una disminución del 2.3% (13.7 a 13.4 mg/dL) a 21% (16.4 a 13.0 mg/dL) cuando se le adicionó una fuente adicional de tocotrienoles.

En cuanto a las dietas con adición de colesterol, se observó que todas causaron un aumento en los niveles plasmáticos de las LDL, pero que aquellas que tenían trigo adicionado produjeron un menor incremento, siendo así que el tratamiento de oliva con colesterol produjo un aumento de 67.2% (13.8 a 23 mg/dL) mientras que la misma dieta con adición de trigo causó un aumento de 48.4% (15.9 a 23.6 mg/dL). Es importante resaltar que aun cuando los tratamientos con palma y colesterol también causaron aumento en los niveles plasmáticos de LDL, este incremento fue menor que el observado en los tratamientos con oliva y colesterol, siendo así que el tratamiento con palma y colesterol produjo un incremento de los valores de LDL del 43.6% (15.7 a 22.6 mg/dL) y cuando a este tratamiento se le incluyó una fuente adicional de tocotrienoles, el trigo, el incremento fue de 26.5% (17.1 a 21.7 mg/dL).

Al analizar el comportamiento de las desviaciones estándar (parte B de la Figura 42), se apreció que durante todo el experimento se mantuvieron relativamente altas, heterogeneidad propia de las diferencias biológicas entre conejos.

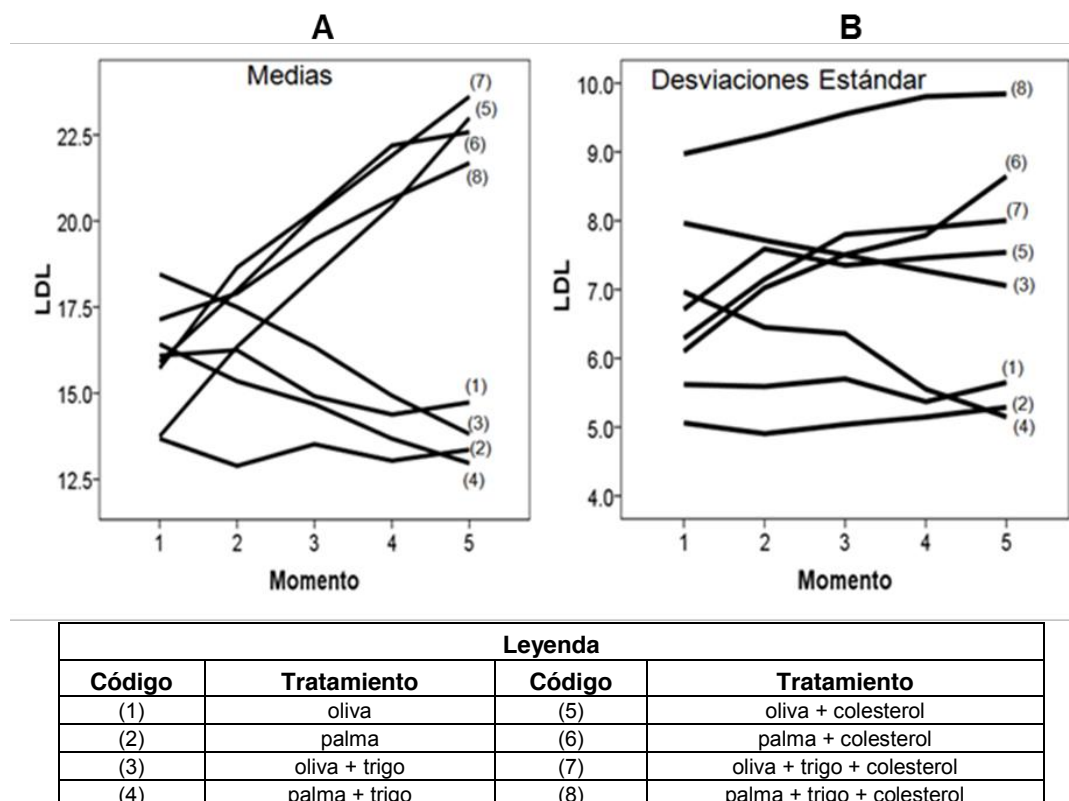


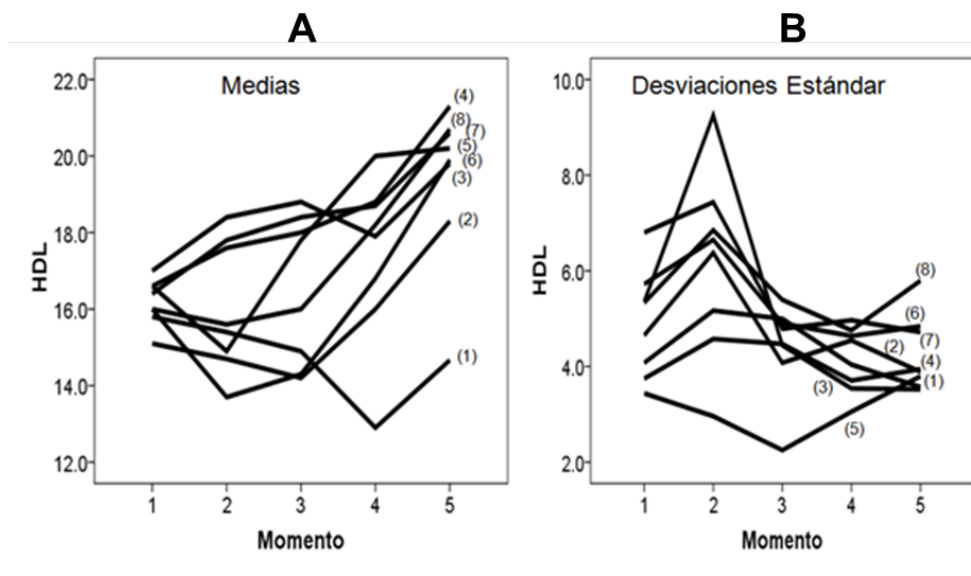
Figura 42: LDL Media y Desviación estándar en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento

Como se puede observar en la parte A de la Figura 43, el comportamiento de las medias en los diferentes tratamientos tiene un comportamiento diferente al observado en los parámetros colesterol total y LDLc.

Al analizar los tratamientos sin colesterol adicionado, se observó que solamente el tratamiento sin fuente de tocotrienoles, oliva, produjo una disminución en los niveles plasmáticos de HDL, siendo así que paso de 15.8 a 14.7 mg/dL con un porcentaje de disminución del 7.2%. Por el contrario, los tres tratamiento restantes tuvieron un efecto positivo sobre los niveles plasmáticos de este parámetro con valores de oliva + trigo 16.5% (17 a 19.8 mg/dL), palma 21.2% (15.1 a 18.3 mg/dL) y palma + trigo 28.3% (16.6 a 21.3 mg/dL).

En cuanto a las dietas con adición de colesterol, se observó que todas causaron un aumento en los niveles plasmáticos de las HDL, pero que aquellas que tenían trigo adicionado produjeron un mayor aumento, siendo así que el tratamiento de oliva con colesterol produjo un aumento de 21.69% (16.6 a 20.2 mg/dL) mientras que la misma dieta con adición de trigo causó un aumento de 25.6% (16.4 a 20.6 mg/dL). En cuanto a las dietas con palma y colesterol se observó que se mantuvo la tendencia al incremento de este parámetro al igual que se observó en las dietas de palma sin colesterol, siendo así que la dieta de palma + colesterol produjo un incremento en los niveles plasmáticos de HDL del 24.4% (16.0 a 19.9 mg/dL) y cuando a este tratamiento se le incluyó una fuente adicional de tocotrienoles, el trigo, el incremento fue de 29.4% (16.0 a 20.7 mg/dL).

Al analizar el comportamiento de las desviaciones estándar (parte B de la Figura 43), se apreció una tendencia a disminuir y a diferenciarse los grupos.



Leyenda			
Código	Tratamiento	Código	Tratamiento
(1)	oliva	(5)	oliva + colesterol
(2)	palma	(6)	palma + colesterol
(3)	oliva + trigo	(7)	oliva + trigo + colesterol
(4)	palma + trigo	(8)	palma + trigo + colesterol

Figura 43: HDL Media y Desviación estándar en los diferentes momentos del estudio según tipo de tratamiento

Para controlar el efecto de la variabilidad biológica de los conejos y aislar los efectos individuales de los diferentes factores que en el estudio influyeron sobre el perfil lipídico se ajustó un modelo de efectos aleatorios para observaciones repetidas (Anexo 13). De nuevo, en este modelo el aporte de los conejos al perfil lipídico se consideró como una variable aleatoria como es usual en los modelos de componentes de la varianza. Las Figuras 44, 45 y 46 muestran la distribución *a posteriori* de la diferencia al final del experimento entre cada uno de los tratamientos teniendo la dieta con aceite de oliva como referencia.

La Figura 44 presenta la distribución *a posteriori* del efecto de cada tratamiento sobre el colesterol total tomando como referencia el efecto del aceite de oliva, es decir en la Figura se presenta la diferencia del efecto de cada tratamiento con el tratamiento del aceite de oliva, por ello el valor 0 representa la semejanza entre ambos efectos.

La Tabla 24 complementa la información sobre la distribución *a posteriori* del efecto de los tratamientos al presentar la probabilidad de que su efecto sobre el colesterol total sea mayor que el del aceite de oliva. Al analizar las distribuciones *a posteriori* de los efectos

se obtuvo una ligera certidumbre (probabilidad de aproximadamente el 65%) de que su efecto sea mayor que el de la oliva, evidencia no muy fuerte que unida a la distribución percentilar de los efectos de la palma permitió afirmar que este tratamiento incrementó ligeramente los niveles de colesterol que produciría el aceite de oliva.

Tabla 24: Certidumbre de que cada uno de los tratamientos considerados presenten un efecto mayor al del aceite de oliva

Tratamiento	Probabilidad (pr) de un efecto mayor al de la oliva		
	Colesterol Total	LDLc	HDLc
Palma	0,6530	0,2540	0,7379
Oliva + Trigo	0,3317	0,6150	0,9823
Palma + Trigo	0,3467	0,4267	0,9869
<hr/>			
Oliva + Colesterol	1,0000	0,8523	0,9714
Palma + Colesterol	0,9998	0,9346	0,8249
Oliva + Colesterol + Trigo	0,9995	0,9306	0,9771
Palma + Colesterol + Trigo	0,9925	0,9077	0,9422

Al añadir trigo a los aceites de palma y oliva respectivamente ese patrón de comportamiento se invirtió; en este caso se pudo afirmar que los niveles de colesterol producido por estos dos tratamientos fueron semejantes entre si, como se aprecia en la Figura 44 y disminuyeron ligeramente los niveles de colesterol al compararlos con el tratamiento con aceite de oliva, las probabilidades de que esto ocurra, según las correspondientes distribuciones *a posteriori*, fueron respectivamente de aproximadamente 67% y 65%.

Al añadir colesterol a los aceites de palma y oliva respectivamente se apreció en las distribuciones *a posteriori* un incremento relevante en el efecto de estos aceites sobre el colesterol total, siendo la probabilidad de que su efecto sea mayor del de la oliva del 100%; sin embargo el incremento que se produjo al añadir colesterol a los aceites disminuyó al introducir trigo como un tercer elemento en la constitución del tratamiento; esta afirmación quedó claramente sustentada al comparar las distribuciones *a posteriori* correspondientes. A pesar de la disminución del colesterol total, lograda al introducir trigo en los tratamientos que combinaban los aceites con colesterol, esta disminución no significó que el efecto de los aceites combinados con colesterol y trigo fuera semejante al de sus efectos individuales ni al que tendrían combinados solamente con trigo, tal y como se evidencia al comparar las correspondientes distribuciones *a posteriori* en la Figura 44. La probabilidad de que el efecto de los tratamientos con los aceites, combinados respectivamente con colesterol y trigo, fuera mayor que el del aceite de oliva fueron respectivamente de aproximadamente el 100%, como aparece en la Tabla 24.

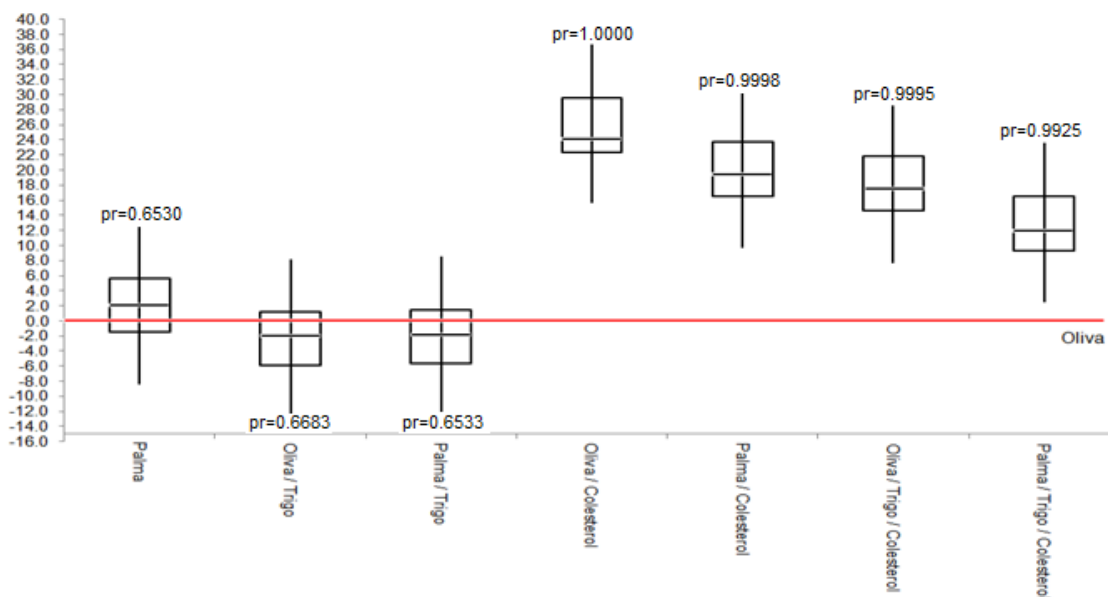


Figura 44: Distribución *a posteriori* del efecto de los tratamientos sobre el Colesterol Total, en relación con el efecto del aceite de oliva

Al igual que con el colesterol total, la Figura 45 presenta la distribución *a posteriori* del efecto de cada tratamiento sobre el LDLc tomando como referencia –valor 0– el efecto del aceite de oliva. Como se observa, en este caso el tratamiento con aceite de palma presentó una leve disminución de los valores de su efecto comparado con el aceite de oliva con una certidumbre de ocurrencia del 75% (Tabla 24).

Al analizar los tratamientos con colesterol adicionado se observó, en las correspondientes distribuciones *a posteriori* de los efectos, que estos produjeron un incremento en los niveles plasmáticos del LDL comparados con los que produciría el aceite de referencia; la certidumbre de que tales efectos sean mayores que el producido por el aceite de oliva sobre el colesterol total en cada caso son de 85% y 93% para el tratamiento con oliva y palma respectivamente. Sin embargo, es importante notar que el efecto de amortiguación producido por los tocotrienoles de la harina de trigo que se observó en el caso del colesterol, no se manifiesta en el LDLc del tratamiento con oliva, aunque sí se observa sutilmente en el tratamiento con palma.

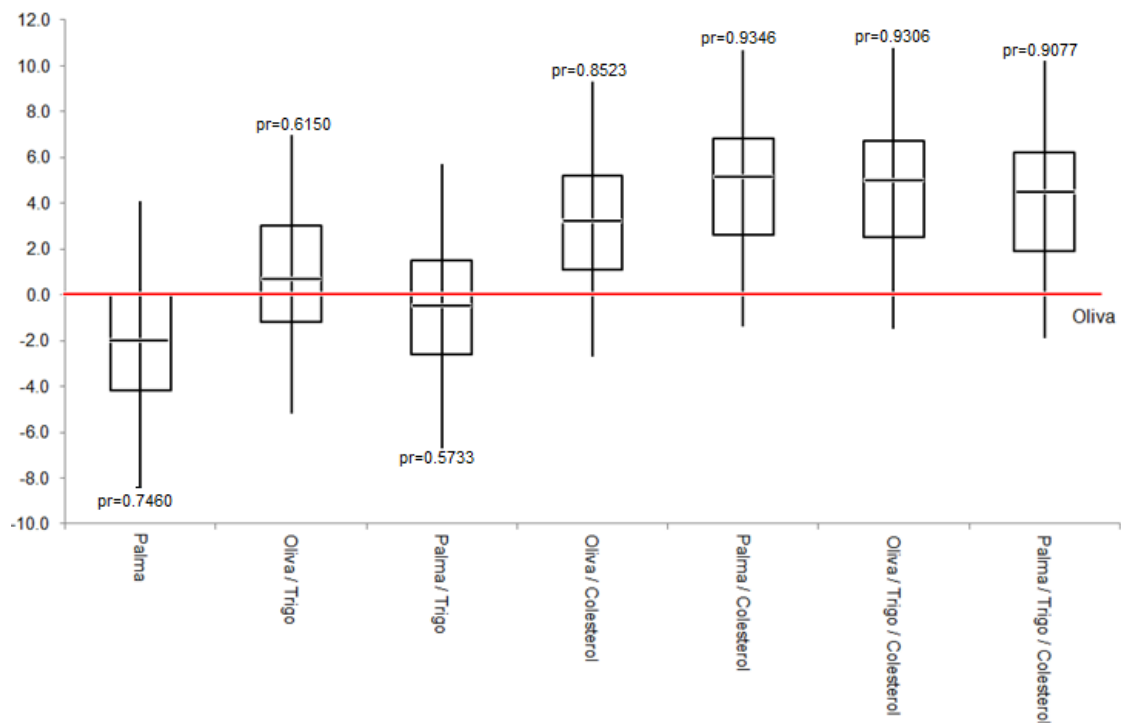


Figura 45: Distribución *a posteriori* del efecto de los tratamientos sobre el LDL, en relación con el efecto del aceite de oliva

Al igual que las dos componentes del perfil lipídico analizadas anteriormente, la Figura 46 presenta la distribución *a posteriori* del efecto de cada tratamiento sobre el HDLc tomando como referencia –valor 0- el efecto del aceite de oliva. Como se observa, en este caso el tratamiento con aceite de palma elevó los valores del HDL con respecto al aceite de oliva con una certidumbre de ocurrencia del 74% (Tabla 24).

Al incorporar una fuente adicional de tocotrienoles (trigo), tanto al tratamiento con palma como al tratamiento con oliva, se observa que éste produce un efecto positivo al determinar las distribuciones a posteriori de los efectos un aumento relevantemente en los niveles de HDLc, como se aprecia en la Figura 46 y en las probabilidades correspondientes de la Tabla 24.

Al analizar los tratamientos con colesterol adicionado se observó, en las correspondientes distribuciones a posteriori de los efectos, que estos produjeron un incremento en los niveles plasmáticos de HDLc comparados con los que produciría el aceite de referencia; la certidumbre de que tales efectos sean mayores que la producida por el aceite de oliva sobre el colesterol total en cada caso son cercanas a 1 como se aprecia en la Tabla 22. Finalmente, cuando a los tratamientos con colesterol se les adicionó trigo como fuente adicional de tocotrienoles, se observó que éste produjo un incremento en los niveles plasmáticos de HDL comparados con los tratamientos con solo colesterol adicionado. Así mismo, se observó que tenían un efecto positivo al ser comparadas con el aceite de oliva, con unas probabilidades cercanas a 1 como se aprecia en la Tabla 24.

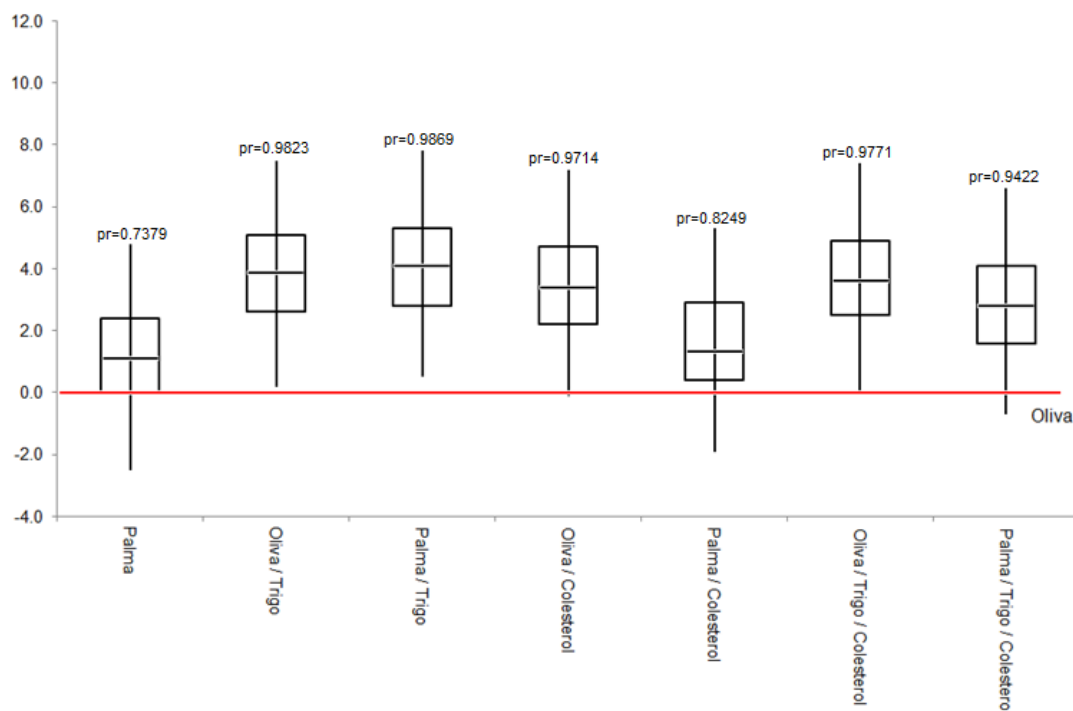


Figura 46: Distribución *a posteriori* del efecto de los tratamientos sobre el HDL, en relación con el efecto del aceite de oliva

- **Efecto acumulativo de los tratamientos**

En la gráfica 47 se aprecia la manera como el tiempo afecta los diferentes parámetros estudiados. En este caso se toma como base de comparación las medias de los parámetros en el momento 1, es decir, los valores iniciales.

El modelo de efectos mezclados utilizado en los análisis aísla el efecto de diferentes factores que influyen sobre las variables del perfil lipídico. La Figura 47 muestra las distribuciones *a posteriori* del efecto del momento en que se hizo la evaluación del colesterol total, HDL y LDL, así como las probabilidades que estos efectos sean mayores que el que acumuló el primer momento de evaluación en la semana 4. Como se puede observar, en el caso del colesterol total y el LDL a medida que se incrementa el tiempo de exposición a los tratamientos incrementa el efecto del momento lo que es una clara evidencia de que a medida que transcurre el tiempo el consumo sistemático de los tratamientos influye directamente en los niveles de colesterol y LDL. En el caso del HDL también se presentó una tendencia asociada a la acumulación de exposición, pero en este caso el efecto que reflejo esta tendencia fue a la disminución, con una ligera modificación en el efecto en el último momento de evaluación.

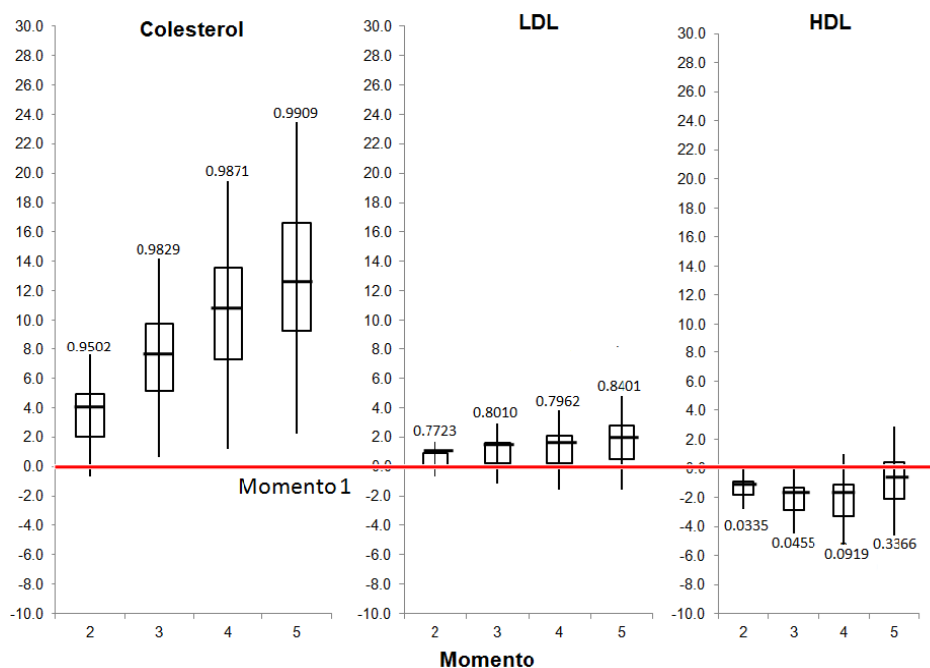


Figura 47: Distribución a posteriori del efecto del momento de la evaluación sobre las variables del perfil lipídico

5.2.3.2. Capacidad oxidativa de las LDL:

La presencia de dienos producto de la peroxidación en presencia de cobre se observan con mayor fuerza a partir de los 150 minutos de incubación (Figuras 48 y 49).

En la Figura 48 se puede observar claramente que las lipoproteínas de los animales alimentados con aceite de oliva a las cinco horas sufrieron una peroxidación mayor que las de los alimentados con palma. La diferencia entre oliva y palma fue de: $9.15 - 5.42 = 3.73 \mu\text{moles}$ ($\epsilon = 29500$). La presencia de T3E disminuyó la peroxidación, siendo así que la diferencia entre oliva y oliva + trigo fue $= 9.15 - 8.14 = 1.1 \mu\text{moles}$ y la diferencia entre palma y palma +trigo fue $= 5.42 - 4.74 = 0.68 \mu\text{moles}$.

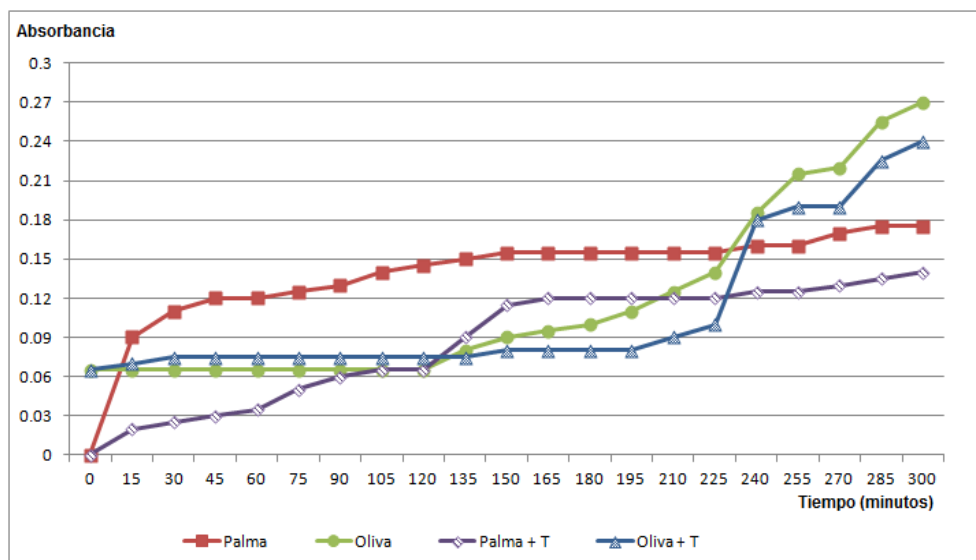


Figura 48: Cinética de la formación de dienos conjugados en LDL de conejos alimentados con dietas si colesterol, con y sin adición de trigo

Como se observa en la Figura 49, se presentó una mayor tendencia a la formación de dienos conjugados en los conejos que consumieron dietas con colesterol. Toda vez que todas las grasas contienen ácidos grasos insaturados, esto no es de extrañar. Pero se ve claramente que la presencia de colesterol incrementó la velocidad de peroxidación: En efecto, la diferencia en dienos conjugados entre las lipoproteínas de conejos alimentados con oliva + colesterol y las de palma + colesterol fue de $15.25 - 7.12 = 8.13 \mu\text{moles}$ ($\epsilon = 29500$). Nótese que los incrementos fueron menores en el caso de las dietas que contienen T3E, como era de esperar, siendo así que la diferencia entre oliva + colesterol y oliva + trigo + colesterol fue $= 15.15 - 13.56 = 1,59 \mu\text{moles}$ y la diferencia entre palma + colesterol y palma + trigo + colesterol fue $= 7.12 - 5.08 = 2.04 \mu\text{moles}$.

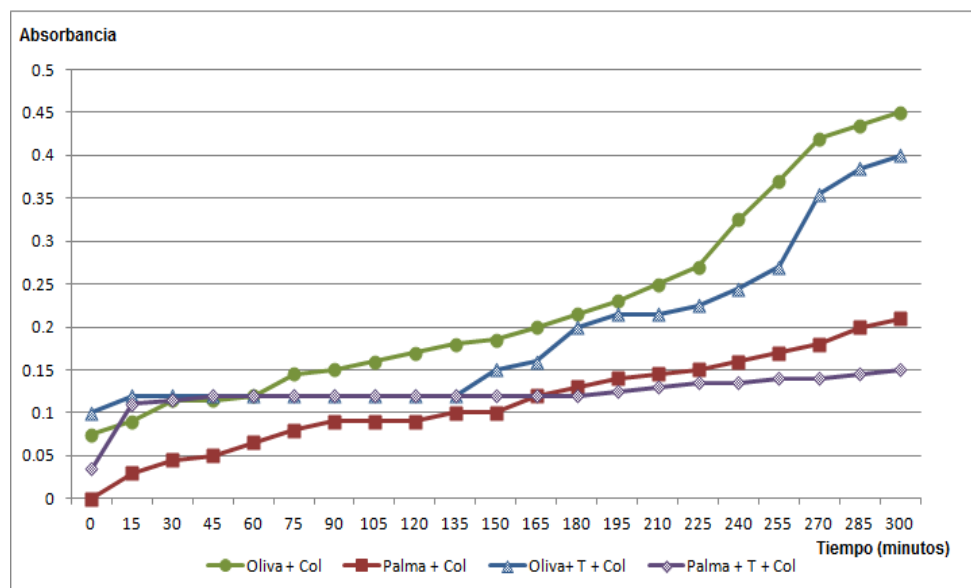


Figura 49: Cinética de la formación de dienos conjugados en LDL de conejos alimentados con dietas con colesterol, con y sin adición de trigo

5.3. Fase III, Experimentación en humanos

El principal objetivo de esta Fase fue evaluar el efecto de los tocotrienoles naturales adicionados a la dieta usual de individuos sanos sobre el perfil lipídico y la capacidad oxidativa de las LDL.

Los dos grupos de sujetos, todos mujeres, que fueron incluidos en el estudio cumplieron con los criterios descritos en la metodología. Durante un mes recibieron semanalmente 30 cc de aceite por persona por día, que aportaban 34.5 mg de tocotrienoles y 8 de tocoferoles en el caso del aceite de palma y 48.9 mg de tocoferoles en el caso del aceite de soya. Esta cantidad de aceite era suficiente para cubrir sus requerimientos nutricionales y los de su familia. Al inicio y al final del período del ensayo se determinaron colesterol plasmático, LDLc y HDLc. Todos los sujetos que aceptaron inicialmente participar, terminaron el tratamiento que se les asignó de manera aleatoria. En la Tabla 25 aparecen los datos de edad, talla y peso de las participantes.

Como se observa en la Tabla anterior, los dos grupos fueron homogéneos en sus características demográficas, siguiendo los lineamientos dados en los criterios de inclusión planteados.

Tabla 25: Datos descriptivos de los sujetos por grupo de tratamiento, media (DE)

Características	Tratamientos	
	Soya	Palma
Edad (años)	25 (3)	27(2)
Talla (cms)	165.4 (3.7)	162.8 (4.2)
Peso (Kg)	57 (3.8)	55.7 (3.9)

5.3.1. Perfil lipídico

- **Valores iniciales**

En la Tabla 26 se presentan las medias y desviación estándar de los parámetros lipídicos analizados al inicio del estudio.

Tabla 26: Valores iniciales del perfil lipídico

Perfil lipídico mg/dL	Característica	Tratamientos	
		Soya	Palma
Colesterol	n	15	15
	Media (DE)*	177.07 (17.66)	182.60 (20.08)
	Mínimo	149	127
	Máximo	200	200
LDL	n	15	15
	Media (DE)*	105.67 (18.42)	106.13 (14.70)
	Mínimo	75	79
	Máximo	133	133
HDL	n	15	15
	Media (DE)*	52.40 (6.98)	48.93 (6.64)
	Mínimo	40	34
	Máximo	64	61

Para analizar las diferencias entre los valores medios de los grupos de tratamiento al inicio del estudio, se ajustó un modelo de análisis de varianza de clasificación simple. La distribución *a posteriori* de los valores medios de cada tratamiento se presentan en la Figura 50

Como se observa, los dos grupos de tratamiento presentaron homogeneidad al inicio del estudio en cada una de las variables con media de 177.07 y 182.6 mg/dL de colesterol

total para los grupos que usaron aceites de soya y de palma respectivamente; 105.67 y 106.13 mg/dL para LDLc y 52.4 y 48.93 mg/dL para HDLc. Esta homogeneidad de todas maneras muestra ligeras discrepancias en los valores individuales en cada grupo de tratamiento, como se aprecia tanto en las desviaciones estándar como en el recorrido intercuartílico de los diagramas que representan la distribución de los valores de las variables en cada uno de los grupos de tratamiento.

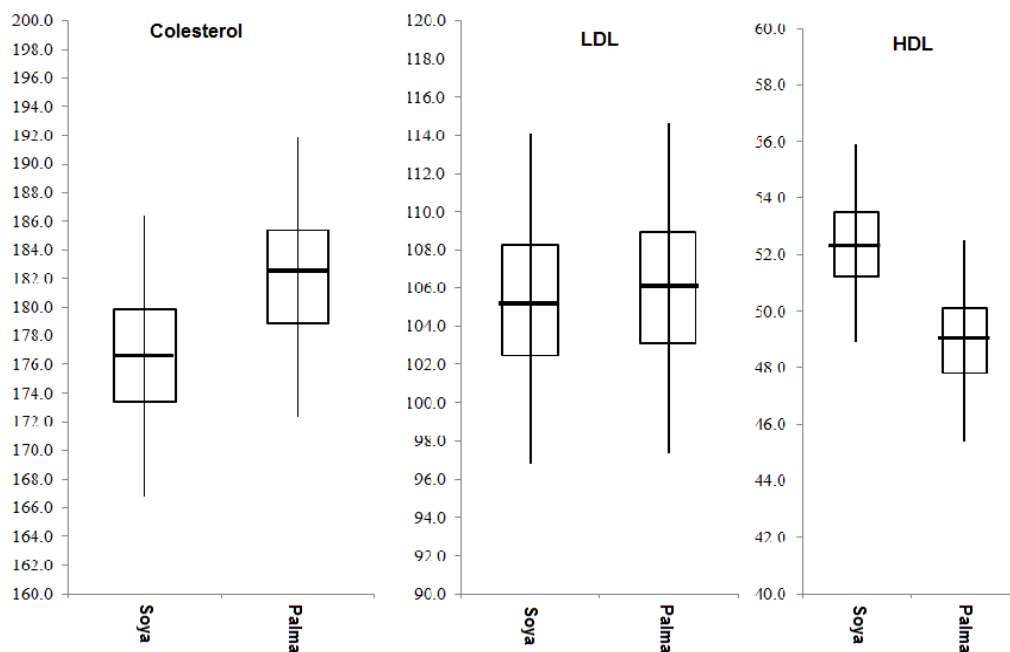


Figura 50: Distribución *a posteriori* de la media del perfil lipídico al inicio del estudio

- **Efecto de los tratamientos sobre el perfil lipídico**

En la Tabla 27 aparecen los valores de los parámetros lipídicos inicial y final del período de tratamiento.

Como se puede observar, ambos tratamientos resultaron en una disminución del orden del 5% para colesterol plasmático y del 7% para el LDLc sin diferencia observable entre los dos. En el caso del HDLc, se observa una disminución discreta en el tratamiento con soya (-2.1%) y una aumento en el tratamiento con palma (4.4%).

Tabla 27: Valores iniciales y finales del perfil lipídico

Parámetro	Característica	Tratamientos			
		INICIAL		FINAL	
		Soya	Palma	Soya	Palma
	n	15	15	15	15
Colesterol	Media (D.E.)	177.07 (17.66)	182.60 (20.08)	167.0 (17.7)	173.2 (17.1)
	Mínimo	149	127	146	154
	Máximo	200	200	197	192
LDLc	Media (D.E.)	105.67 (18.42)	106.13 (14.70)	98.5 (17.7)	98.3 (12.5)
	Mínimo	75	79	77	78
	Máximo	133	133	130	120
HDLc	Media (D.E.)	52.40 (6.98)	48.93 (6.64)	51.3 (6.4)	51.1 (7.8)
	Mínimo	40	34	41	30
	Máximo	64	61	60	60

Para controlar el efecto de las variables de la dieta sobre los valores del perfil lipídico en cada uno de los grupos de tratamiento y aislar así el efecto específico de los dos tratamientos sobre las variables del perfil lipídico, se utilizó un modelo de análisis de covarianza controlando las variables de la ingesta de grasa y vitamina E de la dieta usual de los individuos.

En la Figura 51 se presenta la distribución *a posteriori* de la diferencia entre los valores medios de las variables del perfil lipídico producidos por el uso de la soya y de la palma respectivamente. La diferencia de valores medios que se presenta son valores medios ajustados controlando las dos covariables del modelo como es usual en el análisis de covarianza. La Figura 51 presenta también las probabilidades de que las diferencias de medias analizadas sean mayores que 0.

Los datos graficados muestran que el efecto de los dos tratamientos sobre los parámetros colesterol y LDL, fue similar. En el caso del colesterol se observa una leve tendencia a que el tratamiento con palma produzca valores mayores del colesterol total que el tratamiento con soya, efecto que se puede asegurar con una certidumbre de 0.6865. En cuanto al LDL, se observa que los dos tratamientos tienen un comportamiento similar puesto que la probabilidad que la palma eleve las LDL más que la soya tiene una certidumbre de apenas 0.4045. Por el contrario, es claro que la soya disminuye claramente el valor del HDLc en relación con la palma, lo cual se puede asegurar con una certidumbre del 100%. Este análisis corrobora lo expresado en relación con la presentación de los datos de las diferencias entre las medias final e inicial de este parámetro.

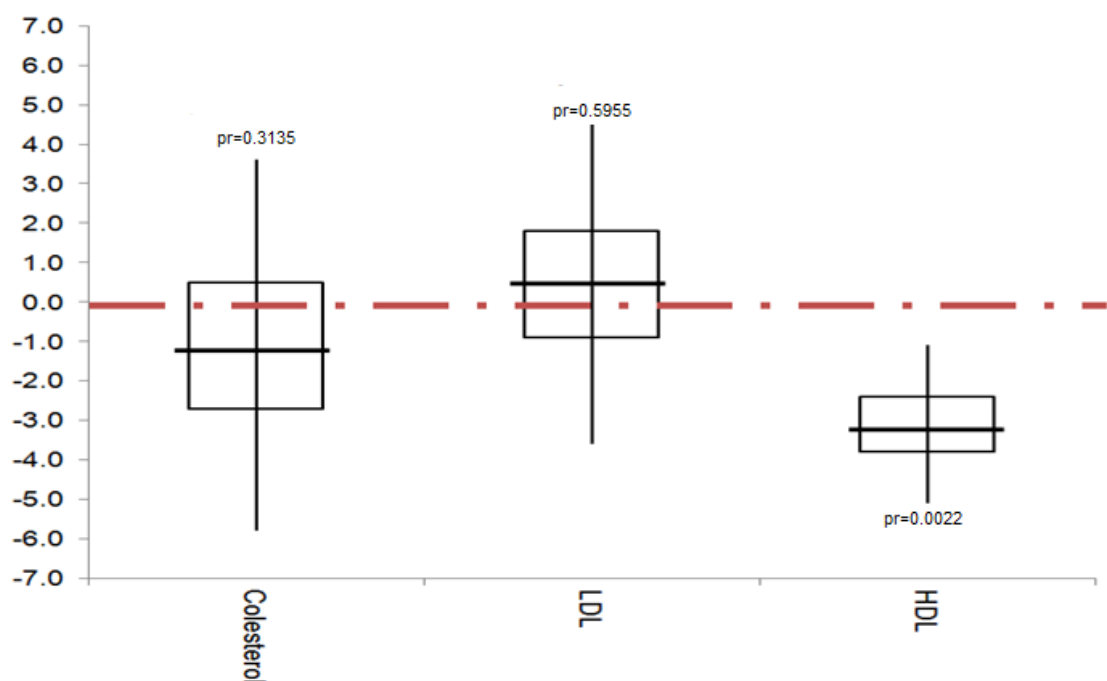


Figura 51: Distribución a posteriori del efecto del tipo de aceite sobre la variación (final – inicial) del perfil lipídico

• **Aporte nutricional de la dieta**

Teniendo en cuenta que los individuos en los tratamientos no recibieron una dieta pre-establecida, sino que continuaron con su dieta usual, era importante realizar un control estricto de dichos consumos para asegurar que las dietas individuales no fueran las responsables de los efectos observados. Para tal fin, cada individuo llevó un diario de consumo detallado de todos los alimentos/bebidas ingeridas durante el día. A continuación se presentan los valores promedios y las desviaciones estándar (entre paréntesis) de los consumos de energía, grasa y vitamina E que se consideró podrían interferir con los resultados.

Tratamiento	Energía (Kcals)	Grasa (gm)	Energía aportada por grasa (%)	Vitamina E (mg)
Soya	1642 (263.2)	57.8 (8.07)	31.8	6.02 (0.89)
Palma	1617 (296.7)	58.0 (9.04)	32.5	6.00 (0.86)

Como se puede observar, la dieta de los dos grupos de participantes fue muy similar, de manera que se puede esperar que la dieta no sea un factor que influya sobre los resultados del ensayo.

La Figura 52 muestra, de acuerdo con el modelo de análisis de covarianza utilizado, el efecto de la grasa aportada por los alimentos de la dieta usual pudo haber tenido sobre los parámetros de perfil lipídico.

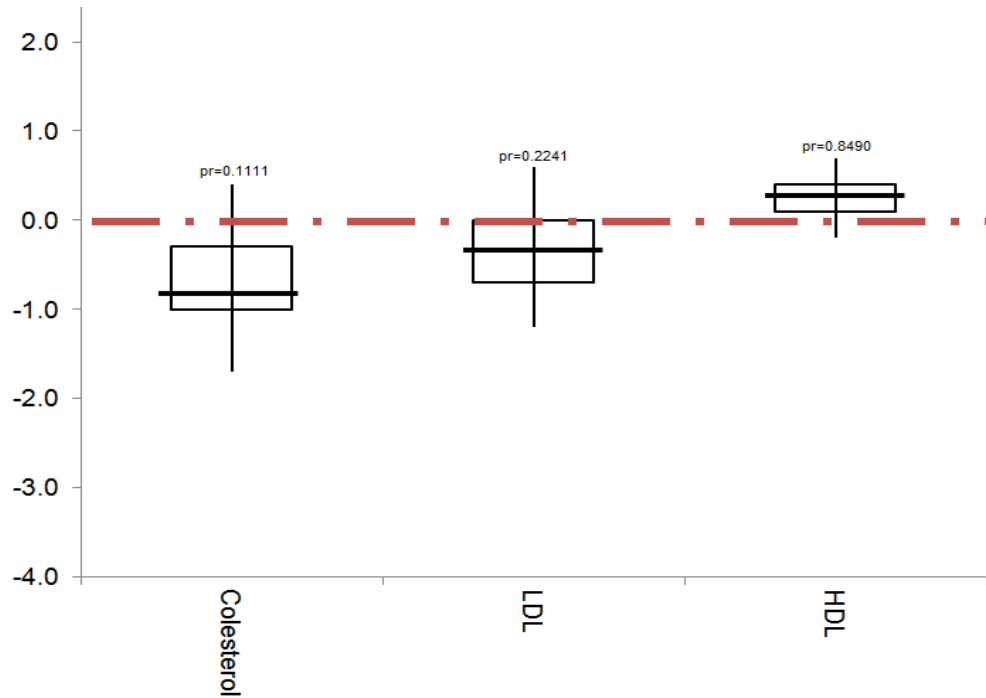


Figura 52: Distribución a posteriori del efecto de la ingestión de grasa de la dieta sobre la variación (final –inicial) del perfil lipídico

Como se puede observar en las distribuciones a posteriori del efecto del consumo de grasa de la dieta, que se presentan en la Figura 52, este tuvo un leve impacto sobre los cambios en los niveles de colesterol plasmático. A conclusiones semejantes se arriba al analizar la Figura 53 en la que se analiza el aporte de la vitamina E aportada por la dieta usual.

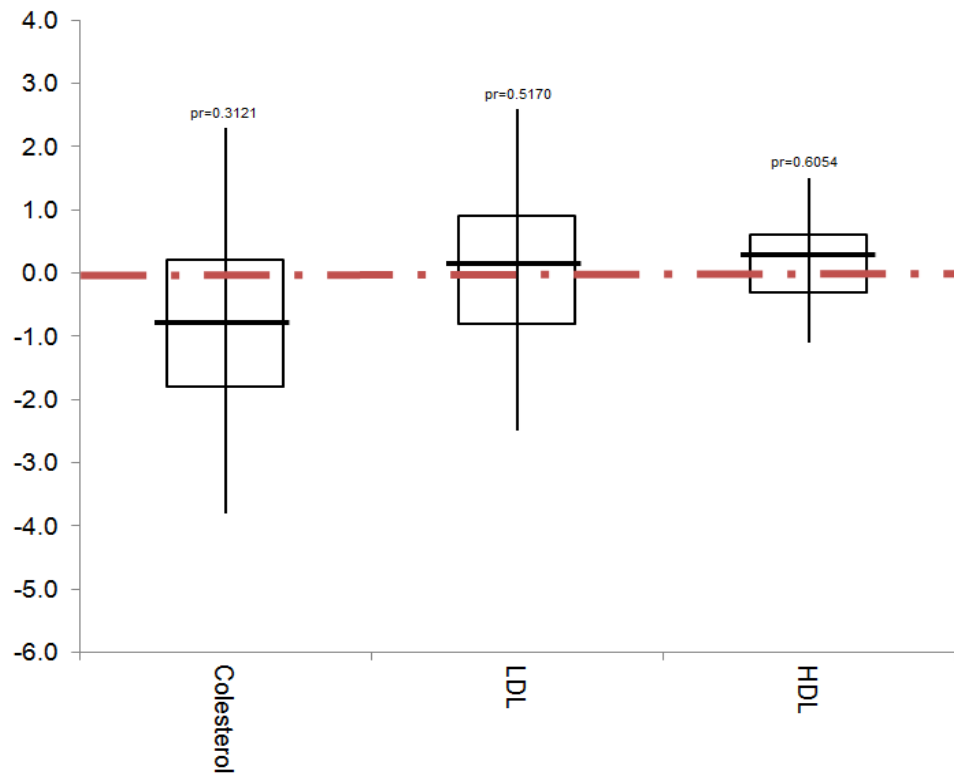


Figura 53: Distribución a posteriori del efecto de la ingestión de vitamina E de la dieta sobre la variación (final –inicial) del perfil lipidico

5.3.2. Capacidad oxidativa de las LDLc

Al igual que en el ensayo de 2 de la fase animal, se determino la capacidad oxidativa de las LDL al final del tratamiento. Para tal fin se siguió la misma metodología previamente descrita.

En la Figura 54 se puede observar claramente que las LDLc de los sujetos que incluyeron aceite de palma en su alimentación usual sufrieron menos peroxidación que los que incluyeron aceite de soya. La diferencia entre soya y palma fue de $13.22 - 5.59 = 7.63$ μmoles ($\epsilon = 29500$). Igualmente, se observa que las LDLc de sujetos alimentados con soya iniciaron su peroxidación inmediatamente entraron en contacto con el Cu^+ , la cual se mantuvo constante a través de las 5 horas que duró el ensayo y que en ese momento, aún no se logró un aplanamiento de la curva, lo que indica que se seguían peroxidando. Por otro lado, las LDLc de los sujetos alimentados con palma, iniciaron la peroxidación al entrar en contacto con el Cu^+ , pero a los 60 minutos se observó un aplanamiento de la curva que se mantuvo hasta los 180 min en donde se produjo nuevamente algo de peroxidación sin ser ésta tan grande como la observada al inicio del ensayo.

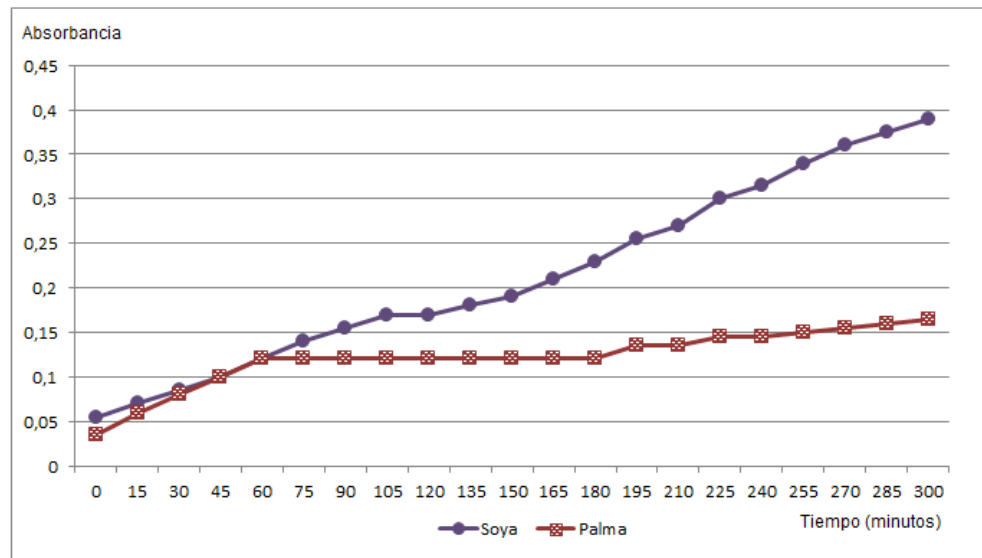


Figura 54 Cinética de la formación de dienos conjugados en LDL de humanos

6. DISCUSION

6.1. Ensayo en animales

Al observar los datos de perfil lipídico resultantes del primer ensayo se puede ver claramente que aun cuando fueron homogéneos al inicio del tratamiento, se fueron diferenciando a medida que el ensayo iba progresando, tanto así que al final se observa claramente, contrario a lo esperado, cómo los dos tratamientos con una relación AGS/AGI baja (soya y girasol) aumentan los niveles de colesterol total y LDL en mayor cantidad que los dos tratamientos que tenían una relación de AGS/AGI más alta (palmoleína y palmoleína híbrida). En cuanto a los niveles de HDL, se encontró que las dietas preparadas con soya y girasol cuya relación AGS/AGI es más baja disminuyen los niveles de HDL. Lo observado en estos resultados es contrario a lo esperado según las ecuaciones desarrolladas por Keys y col en la década de los 50 quienes relacionaron el mayor consumo de grasa saturada a niveles elevados de colesterol sanguíneo (Keys 1984), ecuaciones que predicen razonablemente el incremento del colesterol cuando se utilizan grasas animales y vegetales, observación que posteriormente ha sido confirmada por estudios realizados por Shepherd en 1980, Mattson y Grundy en 1985, (Bowman 1988, Hayes and Khosla 1992, McNamara 1992, Fernandez 1994, Clifton 1998 Jansen 2000, Cater 2001, Li 2003, Van Horn 2008. Por el contrario, se ha demostrado que los ácidos grasos poli y monoinsaturados disminuyen los niveles de colesterol (Shepherd 1980; Mattson 1985). De la misma manera, Denke y col en 1991, encontraron que los AGS de cadena corta, menor de 12 carbonos, tenían un efecto hipercolesterolemiantes en comparación con el ácido esteárico de 18 carbonos.

Los anteriores postulado son en los que se basan las guías actuales para el manejo nutricional de las dislipidemias, las cuales restringen el consumo de todos los AGS para evitar su impacto sobre el colesterol plasmático (NCEP 2002; Retelny 2008). Sin embargo dichas guías no toman en cuenta que existen reportes que demuestran que el ácido palmítico dietario incrementa las concentraciones plasmáticas de colesterol (Mattson 1985; Ng 1992; Gupta 2001). Hasta el momento, no hay una explicación convincente acerca de por qué la presencia de AGS en la dieta incrementan el colesterol sanguíneo y los AGI lo disminuyen. Sin embargo, por lo menos en humanos, este efecto general es modificado por la historia previa de los sujetos, por la presencia o ausencia de colesterol adicionado a la dieta y por el uso de aceites saturados de cadena corta. Es llamativo que estudios en animales y humanos parecen mostrar que si en la grasa dietaria predomina el palmitato sobre otros ácidos grasos, éste no incrementa el colesterol circulante (Mattson 1985; Yli Jokipii 2001; Vega-Lopez 2006; Das 2008; Tholstrup 2011). Este es el caso del aceite de palma cuyo contenido de palmitato es de aproximadamente 48 % y cuyo consumo en humanos no incrementa el colesterol plasmático. (Chong 1991; Marzuki 1991; Ng 1991; Elson 1992; Ebong 1999; Schwenke 2002). Es posible proponer que este efecto "neutro" sobre el colesterol sanguíneo del palmitato se deba a que éste es precisamente el principal producto de la síntesis hepática de ácidos grasos y el palmitato dietariosimplemente incrementaría el pool de ácido endógeno.

Sin embargo teniendo en cuenta que no existe un mecanismo claro del porque los AGS en general o alguno en particular aumentan los niveles de colesterol, se podría pensar

que La diferencia con lo esperado podría ser debida a la presencia de tocotrienoles en los tratamientos con aceite de palma, lo cual concuerda con los resultados observados en el estudio de Qureshi en 1991a con cerdos hipercolesterolemicos en el cual, al adicionar T3E a la dieta, encontraron una disminución en colesterol plasmático del 44% y 66% en las LDL y en el estudio de Sundram en 1990, en el cual se demostró en ratas que no existió diferencia entre los niveles plasmáticos de colesterol en animales alimentados con un tratamiento a base de aceite poliinsaturado vs uno con aceite de palma.

En cuanto a la lipoproteína HDL, se observa que los tratamientos con T3E produjeron un aumento de sus niveles, lo cual corrobora los estudios realizados por Sundram y Lindsey, los dos en 1990, los cuales demostraron que al alimentar animales de experimentación con aceite de palma se elevaban los niveles de esta lipoproteína resultando en una proporción Colesterol/HDL más favorable.

Al observar detalladamente los resultados de los dos tratamientos con aceite de palma es claro que el aceite más alto en oleico (palma híbrida) tiene un menor impacto sobre los niveles plasmáticos de colesterol y LDL que el tratamiento con aceite de palma comercial. Esta diferencia podría estar causada no solo por el efecto que tienen los T3E sobre estos niveles, sino también por el efecto del perfil de ácidos grasos de este aceite. Estos resultados concuerdan con la afirmación hecha por McNamara en 1992 en la cual las concentraciones plasmáticas de LDL se relacionaban directamente con el grado de saturación e inversamente con la longitud de la cadena del ácido graso.

Para controlar el efecto de la variabilidad biológica de los conejos y la acumulación de exposición determinada por los diferentes momentos del estudio sobre el efecto de los diferentes tipos de grasas en el estudio, se ajustó un modelo de efectos mezclados para observaciones repetidas. Se utilizó la dieta de girasol como tratamiento referencia. De acuerdo con esta metodología, se confirmó que el tratamiento con soya se comportó de forma similar al de girasol y que los tratamientos con aceite de palma tuvieron un comportamiento completamente opuesto al de la referencia, efecto que igualmente se demostró ser acumulativo en el tiempo.

Este ensayo permitió demostrar que los tratamientos que presentaron una relación AGS/AGI mayor en presencia de T3E mostraron un mejor efecto sobre niveles plasmáticos de colesterol, LDL y HDL que los que tenían una relación AGS/AGI menor pero que no tenían T3E presentes. Este hallazgo es importante si se tiene en cuenta que aun cuando actualmente es claro que la ECV es multicausal y que los niveles plasmáticos de lipoproteínas es solo uno de los componentes definidos como causas de la formación de placa ateromatosa, el poder controlarlo ha demostrado un efecto benéfico sobre el riesgo a desarrollar ECV (Lobos 2008). Este efecto puede ser debido a dos factores, que en un momento pueden ser acumulativos: el efecto neutro del ácido palmítico sobre los niveles plasmáticos de colesterol y LDL (Sundram 1994) y el de los T3E sobre los mismos parámetros (Lindsey 1990; Pronczuk 1995).

Los resultados del ensayo 2 demostraron que la dieta con aceite de oliva, con una relación AGS/AGI de 0.43 y sin tocotrienoles, produjo una disminución de 11.7% en el colesterol total y 8.7% en LDLc, lo cual se reconoce como un efecto cardioprotector. Estas cifras se asemejan a resultados previamente reportados por diversos autores tanto en estudios con animales como con humanos (Fernandez 1994; Panagiotakos 2004; Vincent-Baudry 2005; Serra-Majem 2006; Martínez-Gonzalez 2009). Sin embargo, los resultados

también demostraron que las HDLc se redujeron en 7%, lo cual igualmente concuerda con resultados reportados anteriormente. Tholstrup 2011, por ejemplo, reportó una disminución del 11% de las HDLc en dietas con aceite de oliva. Este es un aspecto preocupante, por cuanto las HDLc se consideran como benéficas, “colesterol bueno”, y su disminución implicaría un mayor riesgo de ECV.

Al comparar el comportamiento del aceite de palma (Relación AGS/AGI 0.94 y concentración de T3E de 12 mg/día) con el ocurrido con el aceite de oliva, se observó que los valores finales con palma fueron superiores a los de la oliva en un 10%. Este valor confirma lo reportado por Tholstrup y col, quienes en el 2011, demostraron que los niveles de colesterol total se incrementaron un 4.5% al compararlos con aceite de oliva, pero fueron inferiores a lo esperados si se utiliza la ecuación predictiva de Keys. Este comportamiento es posiblemente explicado por la acción de los tocotrienoles del aceite de palma sobre los niveles plasmáticos de colesterol (Qureshi 1991a; Choundhury 1995; Hasselwander 2002)

En cuanto a los valores de HDLc, es importante notar que el comportamiento entre los dos tratamientos es diferente: mientras la palma las aumenta en un 21.2%, la oliva las disminuye en un 7%, diferencia que ya había sido descrita anteriormente por Tholstrup y col en 2011 y que corrobora lo descrito por Müller y col en 2003, quienes afirmaron que dietas con grasa alta en AGS resultaban en valores plasmáticos de HDLc superiores a los observados con dietas altas en AGI.

Al incluir la harina de trigo como fuente adicional de tocotrienoles (20 mg T3E/día), se observó que se potenciaban los efectos anteriormente descritos. Aun cuando en la literatura no se encuentran reportes de estudios realizados con harina de trigo, si existen algunos realizados tanto en humanos como en animales con cebada, avena y salvado de trigo, que demuestran el efecto hipocolesterolemizante de los T3E provenientes de estos cereales (Qureshi 1991 a, b; Parker 1993; Qureshi 1993; Watkins 1993; Khor 1995; Qureshi 1995; Iqbal 2003).

Las dietas con colesterol y su efecto sobre el perfil lipídico han sido ampliamente estudiadas y los resultados son conflictivos teniendo en cuenta que el colesterol plasmático no solo es consecuencia del colesterol dietario sino también de la producción endógena. Estudios como el de Djoussé y col en 2008 reportaron relación entre el colesterol aportado por el huevo y el aumento de la enfermedad cardiovascular. Por otro lado, análisis reciente de los resultados de NHANES (Scrafford 2011) demostraron que no existe relación entre estos dos parámetros. Nuestros resultados, mostraron que al adicionar colesterol 0.1% a las dietas con palma y oliva se produjo un aumento en los niveles de colesterol total y de LDLc, siendo éste mayor en el tratamiento con oliva que con palma, lo cual difiere de los trabajos de Khosla en 1992 y 1993, quienes reportaron en sus estudios realizado en monos *cebus* y *rhesus* que el ácido palmítico dietario incrementa los niveles plasmáticos de colesterol total y LDLc solo en presencia de dietas hipercolesterolémicas o en condiciones que disminuyan la actividad de los receptores de LDL.

Al adicionar harina de trigo, como fuente de T3E, a las dietas hipercolesterolémicas, se observó que se amortiguó el incremento de colesterol y de LDLc en los dos casos y en cuanto a las HDLc se logró un mayor incremento, lo cual al final conlleva a que la relación

colesterol total/HDLc sea más cardioprotectora, resultados estos que concuerdan con los resultados reportados por Hasselwander y col en 2002 y Minhajuddin y col en 2005.

Al analizar los resultados ajustados por los otros factores que pudieran influir sobre los valores del perfil lipídico, específicamente el efecto biológico de los conejos, se confirmó que el tratamiento con palma se comportó de forma diferente al de oliva (tratamiento referencia), siendo así que el primero eleva levemente los valores con respecto al segundo, pero llamativamente disminuye las LDLc. En las dietas normocolesterolémicas con adición de harina de trigo, al compararlas con la referencia, se observó claramente que las dos disminuyen las concentraciones plasmáticas de colesterol total y aumentan las de HDLc; sin embargo, el comportamiento de las LDLc se diferencia levemente observándose que en el tratamiento con palma se disminuyen mientras que en el de oliva se aumentan levemente. Esto último concuerda con lo reportado por Fernandez y McNamara en 1994 quienes reportaron que el aceite de oliva producía aumento de esta lipoproteína en conejillos de Indias, tendencia previamente reportada por Kris-Etherton en 1984 y Beynen en 1987 en modelos de ratón y conejo.

En cuanto a las dietas con colesterol, se observó que el añadir este componente a la dieta en una cantidad que equivalía a 1 huevo diario en los humanos, se presentó un aumento del colesterol total y de LDLc con respecto al tratamiento con oliva, incremento que fue más marcado en los conejos alimentados con el tratamiento con oliva. Al adicionar harina de trigo a estos tratamientos, se observó que se amortiguó el incremento observado en los niveles de colesterol total y de LDLc y se produjo un mayor incremento en los niveles de HDLc, resultados que concuerdan con lo reportado en el estudio de Hasselwander y col en 2002, quienes reportaron que luego de 6 semanas de tratamiento con T3E, los conejos alimentados con dietas hipercolesterolémicas, mostraron una disminución de los niveles de colesterol total del 22% que se atribuyó principalmente a una reducción del 23% en los niveles de LDLc y a un aumento del 14% en los niveles de HDLc. Sin embargo, Khor y col en 1994, reportaron que dietas con 2% de colesterol adicionado produjeron un aumento mayor del colesterol plasmático en hamsters alimentados con aceite de palma que con aceite de oliva.

Existe evidencia científica que señala a la modificación oxidativa de las LDL como un importante factor que inicia una compleja cadena de eventos que terminan en el desarrollo de la aterosclerosis. Nosotros investigamos la susceptibilidad a oxidación de las LDL de plasma de conejos luego de haberlos alimentado con dietas con diferente relación de AGS/AGI en presencia o no de un potente antioxidante como son los tocotrienoles.

Como se puede observar las LDL de conejos alimentados con aceite de palma (relación AGS/AGI = 0.93) siempre presentaron menor grado de peroxidación que las LDL de conejos alimentados con aceite de oliva (relación AGS/AGI = 0.43), lo cual concuerda con resultados presentados previamente por Haidari en 2001. Es importante notar que la adición de colesterol a las dietas con aceite de oliva produce una mayor peroxidación de las LDL, la cual se ve amortiguada si a la dieta se le adiciona una fuente de T3E como es la harina de trigo integral. Nótese, también, que la dieta con palma en ningún caso incrementó la peroxidación con o sin colesterol. Si tenemos en cuenta que la peroxidación sólo se da cuando hay más de un doble enlace, como ocurre en poliinsaturados, es claro por qué el tratamiento con aceite de oliva cuya dieta tenía un aporte relativo de AGPI de 21.6% debía producir unas LDL más oxidables que una dieta con menor aporte de AGPI y fuente de ácido oleico, no peroxidable, como es la de palma.

Es importante resaltar que las lipoproteínas plasmáticas son modificadas por el aporte porcentual de ácidos grasos de la dieta consumida, pero no reflejan exactamente la composición de ácidos grasos de la dieta. En efecto, nuestros resultados mostraron que en las lipoproteínas del grupo alimentado con aceite de girasol las concentraciones de AGS se disminuyeron en un 24.2% mientras que las de AGI aumentaron en un 16.6% en relación con la composición de la lipoproteína al inicio del experimento. Cambios similares se encontraron con las diferentes dietas. Es posible que los cambios sean debidos a que el hígado contribuye palmitato y oleato a las LDL en el momento de su síntesis por lo cual, lo observado en las lipoproteínas del plasma no es una copia exacta del aporte porcentual de ácidos grasos de la dieta sino que tiene un componente endógeno importante.

Siendo la Vitamina E liposoluble, sus vitámeros son transportados principalmente en las lipoproteínas. Al analizar los vitámeros E en nuestros conejos, se observa que en todos los grupos hubo un aumento en los niveles de TF, pero sólo en los grupos que recibieron tratamiento con palma, se observó un incremento en los niveles de T3E. Estas diferencias se pueden explicar con base en el metabolismo diferenciado de la vitamina. Es claro que aproximadamente el 70% de la vitamina ingerida es absorbida a nivel intestinal (Kelleher 1970) y es incorporada a los quilomicrones para ser transportada hasta el hígado (Traber 1996; Brigelius-Flohe 1999), en donde la proteína α -TTP la capta para poder incluirla en las VLDL (Kaempf-Rotzoll 2003). La diferencia radica en la afinidad que tiene la α -TTP por cada uno de los isómeros de la vitamina, siendo así que esta proteína es más afín por los TF que por lo T3E, razón por la cual las lipoproteínas de origen hepático son pobres en T3E (Hosomi 1997). Sin embargo, al tener las dietas un adecuado aporte de vitamina E y una diferencia marcada en las concentraciones de T3E, no es sorprendente que éste se vea reflejado en los valores finales de cada uno de los grupos de isómeros en plasma puesto que, a diferencia de los ácidos grasos, la vitamina E sí refleja lo aportado por la dieta (Fairus 2006; Khosla 2006).

6.2. Ensayo en humanos.

Los resultados de este ensayo mostraron que los dos grupos eran homogéneos en los parámetros lipídicos al inicio del tratamiento. Luego de un mes de consumir el aceite asignado al tratamiento, se observó que no había diferencia entre los dos grupos en cuanto a los valores de colesterol total y LDLc, resultados que concuerdan con los reportados por Marzuki en 1991 en voluntarios jóvenes, pero difieren de los resultados reportados por Bonanone en 1988 quienes evaluaron el impacto de aceite de palma, aceite de cártamo alto en oleico y una grasa transesterificada (43% 18:0 y 40% 18:1) en 11 pacientes de la tercera edad y demostraron que el aceite de palma elevó los niveles de colesterol al compararlos con los otros dos tratamientos.

En cuanto a los valores de HDLc, sí se diferenciaron notablemente, presentándose una disminución del 2.1% en el tratamiento con soya y un aumento del 4% en el tratamiento con palma. Nuestros resultados refuerzan los reportados previamente por Schaefer en 1981 y Jackson 1894 que han descrito el efecto reductor de las grasas poliinsaturadas (aceite de soya) sobre los niveles de HDLc. Igualmente concuerdan con los resultados reportados por Mattson en 1985, quienes alimentaron 20 hombres sanos con dieta líquida que contenía 40% de las calorías provenientes de aceite de palma, aceite de cártamo alto

en ácido oleico o alto en ácido linoléico y demostraron que la concentración de HDLc en los tratamientos con aceite de palma y alto en oleico fueron similares, pero que el tratamiento en linoléico las disminuyó. Finalmente, Truswell en el 2000, al comparar el tratamiento de aceite de palma con diferentes aceites mono o poliinsaturados, encontró que al compararlo con canola, el de palma aumento los niveles de HDLc en un 9%, mientras que al compararlo con el aceite de oliva observó que el de palma produjo niveles más bajos de LDLc y más altos de HDLc.

En cuanto a la capacidad oxidativa de las LDLc, este ensayo permitió confirmar lo observado en el ensayo con animales. Las LDLc obtenidas al final del mes de tratamiento con aceite de soya mostraron una gran tendencia a peroxidación lo cual era de esperarse si se tiene en cuenta que este aceite tiene un porcentaje relativo de AGPI de 60%, mientras que este porcentaje en el aceite de palma es de sólo 11.4%.

7. CONCLUSIONES

- La harina de trigo de tercera es una buena fuente de T3E aportando un total de 483.7 ppm (156.3 ppm de α -T3E y 327.4 ppm de β + γ -T3E), dato reportado por primera vez en la literatura.
- Tanto el aceite de palma y el de palma híbrida son una excelente fuente de T3E, aportando 809.7 ppm y 1189.9 ppm, respectivamente; por el contrario los aceites de girasol y soya son buena fuente de TF (516.2 y 1630.1 ppm., respectivamente). Finalmente, el aceite de oliva es pobre en vitamina E (8 ppm de T3E y 196 ppm de TF).
- La inclusión de aceite de palma en la dieta de conejos, alto en AGS y buena fuente T3E, no produjo un efecto marcado sobre los niveles de colesterol total y sí aumento los niveles de HDLc.
- El introducir colesterol a las dietas semisintéticas (0.1% p/p), produjo un aumento relevante en los valores plasmáticos de colesterol plasmático y LDLc. Sin embargo, dicha elevación se amortiguó cuando a las dietas se les añadió una fuente adicional de T3E (harina de trigo de tercera).
- Las lipoproteínas de los animales alimentados con aceite de oliva a las cinco horas sufrieron una peroxidación mayor que las de los alimentados con palma.
- Se presentó una mayor tendencia a la formación de dienos conjugados en los conejos que consumieron dietas con colesterol que los que consumieron dietas sin colesterol.
- Los T3E no tienen efecto sobre relajación del endotelio, medido por la acción de la acetil colina y la nitroglicerina en anillos de aorta de conejos alimentados con diferentes dietas semisintéticas, efecto coherente con su no acumulación en endotelio ni en células de la media.
- Los valores de colesterol total y LDLc de los sujetos alimentados con aceite de palma (alto en AGS y T3E) fueron similares a los de los sujetos alimentados con aceite de soya (alto en AGPI y sin T3E). Por el contrario, el tratamiento con aceite de palma incremento los niveles de HDLc, mientras que el tratamiento con soya los disminuyó.
- Las LDL de los sujetos alimentados con aceite de soya (alto en AGPI), presentaron mayor susceptibilidad a la peroxidación, lo cual, como se ha demostrado anteriormente, es uno de los principales factores condicionantes para la formación de placa ateromatosa. Sin embargo, las LDL de los sujetos alimentados con aceite de palma sufrieron poca peroxidación.

En términos generales, se puede decir que este estudio demuestra que los T3E dietarios, sin importar su fuente, parecen disminuir o mantener neutro los niveles de colesterol sérico y en algún grado limitar el incremento del mismo cuando a la dieta se le adiciona colesterol. Así mismo, tienen un impacto benéfico sobre los niveles de HDLc.

Llama la atención que las guías de manejo nutricional de la ECV, limitan el uso de algunos alimentos sin tener en cuenta la concentración que éstos pudieran tener de algunos compuestos benéficos para la salud como, por ejemplo, los tocotrienoles, limitando así la variedad de la dieta y por ende la adherencia al tratamiento nutricional.

8. PERSPECTIVAS

Algunos de los posibles trabajos a realizar teniendo como base los resultados de este estudio son:

- Efecto del colesterol adicionado a la dieta sobre la capacidad oxidativa de las LDL.
- Determinación de concentración de T3E en diferentes alimentos de panadería que utilizan cereales fuente del nutriente y en productos procesados preparados con cereales y aceite de palma.
- Efecto del aporte de T3E aportado por dietas preparadas utilizando alimentos habituales de la dieta Colombiana y con diferentes concentraciones de tocotrienoles sobre el perfil lipídico.
- Efecto de los tocotrienoles dietarios sobre el perfil lipídico en pacientes hipercolesterolemicos con y sin tratamiento farmacológico.
- Determinar el efecto que otros posibles componentes del aceite de palma y la harina de trigo de tercera pudieran tener sobre el perfil lipídico y la capacidad oxidativa de las LDL.

9. DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Tanto la estudiante de Doctorado como su tutor y asesor estadístico, declaran no tener conflicto de interés con las industrias productoras de aceites (palma, soya, girasol y oliva) o harina de trigo, ingredientes utilizados para el desarrollo de esta investigación.

10. REFERENCIAS

Abe C., Ikeda S., Uchida T., Yamashita K. and Ichikawa T. Triton WR1339, an inhibitor of lipoprotein lipase, decreases vitamin E concentration in some tissues of rats by inhibiting its transport to liver. *J. Nutr* 2007;137:345-350.

Aggarwal BB., Sundaram C., Prasad S. and Kannappan R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical Pharmacology* 2010;80:1613–1631.

Aschoff L. Em Beitrag zur Myelinfrage. *Verhandl. deutsch. path. Gesellsch.* 1907;10:166.

Azzi A. and Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res* 2000;39(3):231-255.

Azzi A. Vitamin E in Cell Signaling in Packer L. (eds). *The Antioxidant Vitamins C and E*. AOCS Press. Champaign, IL, USA. 2002;195-208.

Azzi A., Ricciarelli R. and Zingg JM. Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Lett* 2002;519(1-3):8-10.

Badimón L., Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(Supl 1):17-26.

Ball R., Stowers E., Button J., Cary N., Skepper J, and Mitchinson M. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* 1995;114:45-54.

Berneis KK. and Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002; 43:1363 - 1379.

Beynen AC., Visser JJ., Scheuten IA. and Katan MB. Cholesterol metabolism in rabbits fed diets containing either com or olive oil. *Nutr Rep Int* 1987;35:111-116.

Birringer M., Pfluger P., Kluth D., Landes N. and Brigelius-Flohé R. Identities and differences in the metabolism of tocotrienols and tocopherols in HepG2 Cells. *J. Nutr* 2002;132:3113-3118.

Black TM., Wang P., Maeda N. and Coleman RA. Palm tocotrienols protect ApoE +/- mice from diet-induced atheroma formation. *J Nut.* 2000;130:2420-2426

Bonanome A. and Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med* 1988;318:1244–1248.

Bond Brill J. The mediterranean diet and your health. *Am J Lifestyle Med* 2009;3:44-56.

- Bowman MP, Van Doren J, Taper LJ, Thye FW and Ritchey SJ. Effect of Dietary Fat and Cholesterol on Plasma Lipids and Lipoprotein Fractions in Normolipidemic Men. *J. Nutr.* 1988;118:555-560.
- Brigelius-Flohe R. and Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999;13:1145-1155.
- Brigelius-Flohé R., Kelly FJ., Salonen JT., Neuzil J., Zingg JM. and Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002;76(4):703-716.
- Buckland G., González CA., Agudo A., Vilardell M., Berenguer A., et al. Adherence to the Mediterranean Diet and Risk of Coronary Heart Disease in the Spanish EPIC Cohort Study *Am J Epidemiol* 2009;170:1518–1529.
- Burton GW., Joyce A. and Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 1982;320(8293):327.
- Campbell J. and Campbell G. The role of smooth muscle cells in atherogenesis. *Curr Opin in Lipidol* 1994;5:323-330.
- Cater N. and Denke MA. Behenic acid is a cholesterol-raising saturated fatty acid in humans. *Am J Clin Nutr* 2001;73:41-44.
- Ceriello A. and Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:816-823.
- CDC. http://www.cdc.gov/heartdisease/statistical_reports.htm. (Consultado abril 18 de 2011).
- Chait A., Brazg R., Tribble D. and Krauss R. Susceptibility of small dense low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype pattern B. *Am J Med* 1993;94:350-356.
- Chandan KS. Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. *Mol Aspects Med* 2007;28(5-6):692-728.
- Chang PN., Yap WN., Lee DT., Ling MT., Wong YC. and Yap YL. Evidence of gamma-tocotrienol as an apoptosis-inducing, invasion-suppressing, and chemotherapy drug-sensitizing agent in human melanoma cells. *Nutr Cancer* 2009;61:357–366.
- Chen CW. and Cheng HH. A rice bran oil diet increases LDL-receptor and HMG-CoA reductase mRNA expressions and insulin sensitivity in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes. *J Nutr* 2006;136(6):1472–1476.
- Chong YH. and Ng TK. Effects of palm oil on cardiovascular risk. *Med J Malaya* 1991;46(1):41-50.

Choudhury N., Tan L and Truswell A.S. Comparison of palmolein and olive oil: effects on plasma lipids and vitamin E in young adults. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1043-1051.

Clifton PM., Noakes M. and Nestel PJ. LDL particle size and LDL and HDL cholesterol changes with dietary fat and cholesterol in healthy subjects. *J Lipid Res* 1998;39:1799-1804.

Cohn W. and Kuhn H. The role of the low density lipoprotein receptor for α -tocopherol delivery to tissues. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:61-71.

Colomé C., Martínez-Gonzalez J., Vidal F., De Castellarnau C. and Badimon L. Small oxidative changes in atherogenesis LDL concentration irreversibly regulate adhesiveness of human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2000;149:295-302.

Comitato R., Leoni G., Canali R., Ambra R., Nesaretnam K. and Virgili F. Tocotrienols activity in MCF-7 breast cancer cells: Involvement of ERbeta signal transduction. *Mol Nutr Food Res* 2010;64:327-332.

Comité Andino de Normalización. Norma andina NA 0073: Aceite de palma OxG Alto oleico. 2009

Consigny PM. Pathogenesis of atherosclerosis. *AJR* 1995;164:553-558.

Conte C., Floridi A., Aisa C., Piroddi M. and Galli F. Gamma-tocotrienol metabolism and antiproliferative effect in prostate cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:391-394.

Corder JA. And Douthwaite DM. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001;414:863-864.

Correll CC., Ng L. and Edwards PA. Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxy- 3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 1994;269:17390-17393.

DANE. Estadísticas vitales de Colombia. (Consultado Mayo 22 de 2012). http://www.dane.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=788&Itemid=119

Das S., Powell SR., Wang P., Divald A., Nesaretnam K., Tosaki A. et al. Cardioprotection with palm tocotrienol: antioxidant activity of tocotrienol is linked with its ability to stabilize proteasomes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H361-H367.

Das S., Lekli I., Das M., Szabo G., Varadi J., Juhasz B., et al. Cardioprotection with palm oil tocotrienols: comparison of different isomers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H970-H978.

Delgado-Roche L. y Martínez-Sánchez G. El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. *Rev Cubana Farm [serial on the internet]* 2009 Apr [cited 2011 Apr 19]; 43(1):. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000100011&lng=en

- Denke MA. and Grundy SM. Effects of fats high in stearic acid on lipid and lipoprotein concentrations in men. *Am J Clin Nutr*. 1991;54: 1036-1040.
- Djouss'e L. and Gaziano JM. Egg consumption in relation to cardiovascular disease and mortality: the Physicians' Health Study. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):964–969.
- Dutta A. and Dutta SK. Vitamin E and its Role in the Prevention of Atherosclerosis and Carcinogenesis: A Review. *J Am Coll Nutr* 2003;22(4):258–268.
- Dutta-Roy AK., Leishman D., Gordon MJ., Campbell FM. and Duthie GG. Identification of a low molecular mass (14.2 kDa) alpha-tocopherol-binding protein in the cytosol of rat liver and heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196(3):1108-1112.
- Elson CE. Tropical oils: nutritional and scientific issues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;31(1-2):79-102.
- Emerson OH., Emerson GA., Mohammad A. and Evans HM. The chemistry of vitamin E. tocopherols from various sources. *J Biol Chem* 1937;122:99-107.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M., Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Rrs Comms* 1989;6(1):67-75.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radial Biol Med* 1992;13:341-390.
- Evans HM. and Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 1922;56:650-651.
- Evans HM., Emerson OH. and Emerson GA. The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *J Biol Chem* 1936;113:319-332.
- Fairus S., Nor RM., Cheng HM. and Sundram K. Postprandial metabolic fate of tocotrienol-rich vitamin E differs significantly from that of α -tocopherol. *Am J Clin Nutr* 2006;84:835–842.
- Falk E. Why Do Plaques Rupture?. *Circulation* 1992;86(suppl III):III30-III42.
- Fernandez ML and McNamara DJ. Dietary Fat Saturation and Chain Length Modulate Guinea Pig Hepatic Cholesterol Metabolism. *J Nutr* 1994;124:331-339.
- Fernandez-Mora T. y Patiño-Cuervo D. La inflamación como factor causal emergente de la enfermedad cardiovascular. *Universitas Scientarum* 2007;12(1):15-33.
- Fitó M, Guxens M, Corella D, et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2007;167(11):1195–1203
- Frank J. Dietary phenolic compounds and vitamin E bioavailability: Model studies in rats and humans. Doctoral dissertation, Sweedish University of Agricultural Sciences 2004. <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000558/>

Freeman MW. Macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipid* 1994;5:143-148.

Freiser H. and Jiang Q. γ -Tocotrienol and γ -Tocopherol are primarily metabolized to conjugated 2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxy-2,7,8-trimethylchroman and sulfated long-chain carboxychromanols in rats. *J Nutr* 2009;139(5):884-889.

Gigerenzer G. We need statistical thinking, not statistical rituals. *Behavioral and Brain Sciences* 1998;21(2):194-195

GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999;354:447-55.

Goodman S. Toward evidence-based medical statistics. 1: The P value fallacy. *Ann Int Med* 1999;130:995-1004.

Goldstein JL. and Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430.

Granot E., Tamir I. and Deckelbaum RJ. Neutral lipid transfer protein does not regulate α -tocopherol transfer between human plasma lipoproteins. *Lipids* 1988;23:17-21.

Gupta SV and Khosla P. Palmitic and stearic acids similarly affect plasma lipoprotein metabolism in cynomolgus monkeys fed diets with adequate levels of linoleic acid. *Nutr* 2001;131: 2115-2120.

Guthrie N., Gapor A., Chambers AF. and Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J Nutr* 1997;127:544S-548S.

Hacquebard M. and Carpentier YA. Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake. *Curr Opin Clin Nutr Met Care* 2005;8:133-138.

Haidari M., Javadi E., Kadkhodae M. and Sanati A. Enhanced Susceptibility to Oxidation and Diminished Vitamin E Content of LDL from Patients with Stable Coronary Artery Disease. *Clin Chem* 2001; 47: 1234 – 1240.

Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1876-1890.

Hasselwander O., Krämer K., Hoppe PP., Oberfrank U., Baldenius K, et al. Effect of feeding various tocotrienol sources on plasma lipids and aortic atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Food Res Inter* 2002;35:245-251.

Hayes KC. and Khosla P. Dietary fatty acid thresholds and cholesterolemia. *FASEB J* 1992;6:2600-2607.

He L., Mo H., Hadisusilo S., Qureshi AA. and Elson CE. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *J Nutr* 1997;127:668–674.

Herrera E. and Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 2001;57(1):43-56.

Hollander D., Rim E., and Muralidhara K.S. Mechanism and site of small intestinal absorption of α -tocopherol in the rat. *Gastroenterology* 1975;68(6):1492-1499.

Hosomi A., Arita M., Sato Y., Kiyose C., Ueda T., Igarashi O, et al. Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 1997;409:105–108.

Hussein D. and Mo H. d-Dlta-tocotrienol-mediated suppression of the proliferation of human PANC-1, MIA PaCa-2, and BxPC-3 pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* 2009;38:e124–e136.

ICBF. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 – ENSIN. <https://www.icbf.gov.co/icbf/directorio/portel/libreria/pdf/LibroENSIN2010.pdf> (Consultado Abril 18 de 2012)

ICONTEC. Norma técnica Colombiana NTC 5713: Aceite de olive alto en oleico OxG (Elaeis oleífera x Elaeis guinnensis). 2009

Ikeda I., Imasato Y., Sasaki E. and Sugano M. Lymphatic transpor of α -, γ - and δ -tocotrienols and α -tocopherol in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996;66:217-221.

International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals. *Br Med J* 1997;336(4):309-315.

Iqbal J., Minhajuddin M. and Beg ZH. Suppression of 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced carcinogenesis and hypercholesterolaemia in rats by tocotrienol-rich fraction isolated from rice bran oil. *Eur J Cancer Prev* 2003;12(6):447–453.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature of tocopherol and related compounds. Recommendations 1981. *Eur. J. Biochem* 1982;123,473-475. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/misc/noGreek/toc.html>

Jackson RL., Kashyap ML., Barnhart RL, Allen C., Hogg E., Glueck CJ. Influence of polyunsaturated and saturated fats on plasma lipids and lipoproteins in man. *Am J Clin Nutr* 1984;39:589-597.

Jang Y., Lincoff AM., Plow EF. and Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-1601.

Jansen S., López-Miranda J., Castro P., López-Segura F., Marín C., Ordovás JM, Paz E. Low-fat and high–monounsaturated fatty acid diets decrease plasma cholesterol ester

transfer protein concentrations in young, healthy, normolipemic men. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:36-41.

Kaempf-Rotzoll DE., Traber MG. and Arai H. Vitamin E and transfer proteins. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:249-254.

Kamal-Eldin A. and Appelqvist LÅ. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996;31(7):671-701.

Kamanna V., Pai R., Ha H. and Kirschenbaum M. Oxidized low-density lipoprotein stimulates monocyte adhesion to glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1999;55:2192-2202.

Kamat JP. and Devasagayam TPA. Tocotrienols from palm oil as potent inhibitors of lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain mitochondria. *Neuro Lett* 1995;195:179-182.

Kayden HJ. and Traber M. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E In humans. *J Lipid Res* 1993;34:343-358.

Kelleher J. and Losowsky MS. The absorption of s-tocopherol in man. *Br J Nutr* 1970;24:1033-1047.

Keys A. Diet and the epidemiology of coronary heart disease. *J.A.M.A.* 1957;164:1912.

Keys A., Menotti A., Aravanis C., Blackburn H., et al. The seven countries study: 2289 deaths in 15 years. *Prev Med.* 1984;13:141-154.

Khor HT and Tan DTS. Serum lipid responses to simultaneous alterations in dietary palmitic and oleic acids in the absence and presence of dietary cholesterol in the hamster. *Nutr Res* 1994;14:1191-1199.

Khor HT., Chieng DY., Ong KK. Tocotrienols inhibit HMG-CoA reductase activity I the guinea pig. *Nutr Res* 1995;15:537-544.

Khor HT., Ng TT. and Raajeswari R. Dose-Dependent Cholesterolemic Activity of Tocotrienols and α -Tocopherol. *Mal J Nutr* 2002;8(2):157-166.

Khosla P., Hayes KC. Comparison between the effects of dietary saturated (16:0), monounsaturated (18:1), and polyunsaturated (18:2) fatty acids on plasma lipoprotein metabolism in cebus and rhesus monkeys fed cholesterol-free diets. *Am J Clin Nutr* 1992;55:51-62.

Khosla P., Hayes KC. Dietary palmitic acid raises plasma LDL cholesterol relative to oleic acid only at high intake of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1993;1210:13-22.

Khosla P., Patel V., Whinter JM., Khanna S., Rakhkovskaya M., Roy S. and Sen C. Postprandial levels of the natural vitamin E tocotrienol in human circulation. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1059-1068.

Kolodgie FD, Katocs AS, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arter Throm Vas Biol* 1996;16:1454–64

Kris-Etherton PM., Ho CY. and Fosmire MA. The effect of dietary fat saturation on plasma and hepatic lipoproteins in the rat. *J Nutr* 1984;114:1675-1682.

Kritchevsky D. Cholesterol and atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 1962;10:269-276.

Kume N., Murase T., Moriwaki H., Aoyama T., Sawamura T., et al. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circulation* 1998;83:332-337.

Kune N., Cybulsky M. and Gimbrone M. Lysophosphatidyl-choline, a component of atherogenic lipoprotein, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:1138-1144.

Lewis LA., Quaife ML. and Page IH. Lipoproteins of serum carriers of tocopherol. *Am J Physiol* 1954;178:221-222.

Li D. and Mehta L. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000;101:2889-2895.

Li Z., Otvos JD., Lamon-Fava S., Carrasco WV, Lichtenstein AH, et al. Men and women differ in lipoprotein response to dietary saturated fat and cholesterol restriction. *J Nutr* 2003;133:3428-3433.

Libby P and Clinton S. The role of macrophages in atherogenesis. *Curr Opin in Lipidol* 1993;4:355-363.

Libby P., Geng Y., Aikawa M. and Schoenbeck U. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin in Lipidol* 1996;7:330-335.

Lindsey S., Benattar J., Pronczuk A. and Hayes KC. Dietary palmitic acid (16:0) enhances high density lipoprotein cholesterol and low density lipoprotein receptor mRNA abundance in Hamsters. *Exp Biol Med* 1990;195:261-269.

Liu X., Yamada N., Osawa T. Assessing the neuroprotective effect of antioxidative food factors by application of lipid-derived dopamine modification adducts. *Methods Mol Biol* 2009;580:143–152.

Liu HK., Wang Q., Li Y., Sun WG., Liu JR., Yang YM., et al. Inhibitory effects of gamma-tocotrienol on invasion and metastasis of human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *J Nutr Biochem* 2010;21:206–213.

Lobos JM., Royo-Bordonada MA., Brotons C., Álvarez-Sala L., Armario P., y col. Guía europea de prevención cardiovascular en la práctica clínica. Adaptación española del CEIPC. *Rev Esp Salud Pública* 2008;82:581-616.

- Lodge JK., Ridlington J., Leonard S., Value H. and Traber MG. and γ -tocotrienols are metabolized to carboxy-ethyl-hydroxychroman derivatives and excreted in human urine. *Lipids* 2001;36:43-48.
- Luscher M. and Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995;118:81-90.
- Martínez-González J., Llorente-Cortés V. y Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:218-231
- Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, et al. Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutr Rev* 2009; 67(suppl 1):S111–S116.
- Martirosyan DM., Miroshnichenko LA., Kulakova SN., Pogojeva AV. and Zoloedov VI. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis* 2007;6(1):1.
- Marzuki A., Arshad F., Razak TA., Jaarin K. Influence of dietary fat on plasma lipid profiles of Malaysian adolescents. *Am J Clin Nutr* 1991;53(4 Suppl):1010S-1014S.
- Mason KE. The first two decades of vitamin E. *Fed Proc* 1977;36(6):1906-1910.
- Matthan NR., Pencina M., LaRocque JM, Jacques PF., D'Agostino RB., Schaefer EJ, et al. Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham Offspring Study participants with CHD. *J Lipid Res* 2009;50:1927–1935.
- Mattson FH. and Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res* 1985;26:194-202.
- McNamara DJ. Dietary fatty acids, lipoproteins, and cardiovascular disease. *Adv. Food Nutr. Res* 1992;36:253-351.
- McNamara DJ. Palm Oil and Health: A Case of Manipulated Perception and Misuse of Science. *J Am Coll Nutr* 2010; 29: 240S - 244S
- Meier R., Tomizaki T., Schulzen-Briese C., Baumann U. and Stocker A. The molecular basis of vitamin retention: structure of human α -tocopherol transfer protein. *J. Mol. Biol.* 2003;331;725-734.
- Mente A, de Koning L, Shannon HS, et al. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2009;169(7):659–669.
- Min KC., Kovall RA. and Hendrickson WA. Crystal structure of human alpha-tocopherol transfer protein bound to its ligand: implications for ataxia with vitamin E deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(25);14713-14718.

Minhajuddin M., Beg ZH. and Iqbal J. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol* 2005;43(5):747-53.

Ministerio de Protección Social. <http://mps.minproteccionsocial.gov.co/vbecontent/NewsDetail.asp?ID=15895&IDCompany=3>. (Consultado abril 18 de 2011)

Ministerio de Salud – Gobierno de Chile. Normas técnicas: Dislipidemia. División de Salud de las Personas. Departamento de Programas de las Personas. Programa Salud del Adulto. 2000

Mohammed HM. Experimental atherosclerosis: A historical overview. *Life Sciences* 2002;70:855–865.

Monterrey, P. $p < 0,05$: ¿Criterio mágico para resolver cualquier problema o leyenda urbana?. Presentado para publicación, *Universitas Scientiarum*

Morton RE. and Zilversmit DB. Inter-relationship of lipids transferred by the lipid-transfer protein isolated from human lipoprotein-deficient plasma. *J Biol Chem* 1983;258:11751-11757.

Muharis SP., Gapor A., Murugan D. and Mustafa MR. Palm oil tocotrienol fractions restore endothelium dependent relaxation in aortic rings of streptozotocin-induced diabetic and spontaneously hypertensive rats. *Nutrition Research* 2010;30(3):209-216.

Müller H., Lindman AS., Brantsæter AL., Pedersen JI. The serum LDL/HDL cholesterol ratio is influenced more favorably by exchanging saturated with unsaturated fat than by reducing saturated fat in the diet of women. *J Nutr* 2003;133:78–83.

Nafeeza MI., Norzana AG., Jalaluddin HL. and Gapor MT. The effects of a tocotrienol-rich fraction on experimentally induced atherosclerosis in the aorta of rabbits. *Malays J Pathol* 2001;23:17–25.

Nakagawa K., Shibata A., Yamashita S., Tsuzuki T., Kariya J., Oikawa S., et al. In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol. *J Nutr* 2007;137:1938–1943.

National Cholesterol Education Program (NCEP). Third report of the expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). NIH Pub. No. 02-5215. Bethesda, MD: National Heart, Lung and Blood Institute, 2002.

Nelis HJ., D’Haese E. and Vermis K. Vitamin E. In: Leenheer AP., Lambert WE., Van Bocxlaer JF. Modern chromatographic analysis of vitamins. New York:Marcel Dekker Inc, 2000, pp 143-228.

Nesaretnam K., Guthrie N., Chambers AF., Carroll KK. Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids* 1995;30:1139–1143.

Ng TK., Hassan K., Lim JB., Lye MS., Ishak R. Nonhypercholesterolemic effects of a palm-oil diet in Malaysian volunteers. *Am J Clin Nutr* 1991;53(4 Suppl):1015S-1020S.

Ng TKW., Hayes KC., DeWitt GF., Jegathesan M., Satgunasingam FN., Ong, ASH. and Tan D. Dietary palmitic and oleic acids exert similar effects on serum cholesterol and lipoprotein profiles in normocholesterolemic men and women. *J Am Coll Nutr* 1992;11: 383-390.

Oliver M. Dietary cholesterol, plasma cholesterol and coronary heart disease. *Br Heart J* 1976;38(3):214-218.

Ong A. Natural sources of tocotrienols. In Packer L, Fuchs J (eds): Vitamin E in Health and Disease. Marcel Dekker, New York. 1993,pp 3-8.

Packer L., Weber U. and Rimbach G. Molecular aspects of α -tocotrienol action and cell signaling. *J Nutr* 2001;131(2):369S-373S.

Packer, L. and U.C. Obermüller-Jevic, Vitamin E: An Introduction. In Packer L,(eds). The Antioxidant Vitamins C and E. AOCS Press: Champaign, IL, USA. 2002, pp 133-151.

Panagiotakos DB., Pitsavos C., Polychronopoulos E., Chrysohoou C., Zampelas A., Trichopoulou A. Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review. *Med Sci Monit* 2004;10(8): RA193-198.

Parhofer KG., Hugh P., Barrett R., Bier DM and Schonfeld G. Determination of kinetic parameters of apolipoprotein B metabolism using amino acids labeled with stable isotopes *J. Lipid Res* 1991;32:1311.

Park SK., Sanders BG. and Kline K. Tocotrienols induce apoptosis in breast cancer cell lines via an endoplasmic reticulum stress-dependent increase in extrinsic death receptor signaling. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Nov;124(2):361-75.

Parker RA., Pearce BC., Clark RW., Gordon DA. and Wright JJ. Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 1993;268:11230-11238.

Pearce BC., Parker RA., Deason ME., Qureshi AA. and Wright JJK. Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. *J Med Chem* 1992;35:3595-3606.

Pearce BC., Parker RA., Deason ME., Dischino DD., Gillespie E., Qureshi AA., Volk K. and Wright JJ. Inhibitors of cholesterol biosynthesis. 2. Hypocholesterolemic and antioxidant activities of benzopyran and tetrahydronaphthalene analogues of the tocotrienols. *J Med Chem* 1994;37(4):526-541.

Pennock JF., Hemming FW and Kerr JD. A reassessment of tocopherol in chemistry. *Biochem Biophys Res Commun* 1964;17(5):542-548.

- Porter TD. Supernatant protein factor and tocopherol-associated protein: an unexpected link between cholesterol synthesis and vitamin E. *J Nutr Biochem* 2003;14(1):3-6.
- Pronczuk A., Khosla P., Hajri T., Hayes KC. Plasma lipids are affected similarly by dietary lauric or palmitic acid in gerbils and monkeys. *Lipids* 1995;30:1157-1161.
- Qureshi AA., Burger WC., Peterson DM. and Elson CE. The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J Biol Chem* 1986;261:10544-10550.
- Qureshi AA., Qureshi N., Halser-Rapacz JO., et al. Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apolipoprotein B, thromboxane B2, and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias. *Am J Clin Nutr* 1991a;53:1042S-1046S
- Qureshi AA., Qureshi N., Wright JJK., et al. Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (Palvitee). *Am J Clin Nutr* 1991b;53:1021S-1026S.
- Qureshi N. and Qureshi AA. Novel hypercholesterolemic agents with antioxidant properties. In: Parker L. and Fuchs J. (Eds), Vitamin E in health and disease. Marcel Dekker, New York, 1993. pp. 247-267.
- Qureshi AA., Bradlow BA., Brace L., et al. Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids* 1995;30:1171-1177.
- Qureshi AA., Bradlow BA., Salseer WA. and Brace LD. Original tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. *Nutrition and biochemistry* 1997;8:290-298.
- Qureshi AA., Peterson DM., Hasler-Rapacz JO. and Rapacz J. Novel tocotrienols of rice bran suppress cholesterol synthesis in hereditary hypercholesterolemic swine. *J Nutr* 2001a;131(2):223-230.
- Qureshi AA., Sami SA., Salseer WA. and Khan FA. Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF(25)) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans. *J Nutr Biochem* 2001b;12(6):318-329.
- Qureshi AA., Sami SA., Salseer WA. and Khan FA. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans. *Atherosclerosis* 2002;161(1):199-207.
- Raederstorff D., Elste V., Aebischer C. and Weber P. Effect of either gamma-tocotrienol or tocotrienol mixture on the plasma lipid profile in hamsters. *Ann Nutr Metab.* 2002;46:17-23.
- Reaven PD., Khouw A., Beltz WF., Parthasarathy S. and Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans: protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arterioscler Thromb* 1993;13:590-600.
- Reidy M. and Bowyer D. Control of arterial smooth muscle cell proliferation. *Curr Opin in Lipidol* 1993;4:349-54.

Retelny VS., Neuendorf A and Roth JL. Nutrition Protocols for the Prevention of Cardiovascular Disease. *Nutr Clin Pract* 2008;23:468-476.

Ricciarelli R., Zingg JM, and Azzi A. The 80th anniversary of vitamin E: beyond its antioxidant properties. *Biol Chem* 2002;383(3-4):457-465.

Rice-Evans C., Bruckdorfer KR. Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Moles Aspects Med* 1992;13:1.

Rimbach G., Minihane AM., Majewicz J., Fischer A., Pallauf J., Virgli F. and Weinberg PD. Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc Nutr Soc* 2002;61(4):415-425.

Roberts WC. The Cause of Atherosclerosis. *Nutr Cli Prac* 2008;23(5):464-467.

Ross R. and Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976a;295:369-377.

Ross R. and Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976b;295:420-425.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective of the 1990's. *Nature* 1993;362:801-809.

Rozeboom W. The Fallacy of the Null-Hypothesis Significance Test. *Psy Bull* 1960;57(5):416-428.

Sakai M., Okabe M., Tachibana H. and Yamada K. Apoptosis induction by gamma-tocotrienol in human hepatoma Hep3B cells. *J Nutr Biochem* 2006;17:672-676.

Schaefer EJ., Levy RI., Ernst ND., Van Sant FD., Brewer HB. The effect of low cholesterol, high polyunsaturated fat, and low fat diets on plasma lipid and lipoprotein cholesterol levels in normal and hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 1981;34:1758-1763.

Schwenke DC., Rudel LL., Sorci-Thomas MG., and Thomas MJ. -Tocopherol protects against diet induced atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *J Lipid Res* 2002;43:1927-1938.

Schneider DJ., Ricci MA., Taatjes DJ., Baumann PQ., Reese JC., Leavitt BJ., et al. Changes in arterial expression of the fibrinolytic system proteins in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3294-3301.

Scrafford CG., Tran NL., Barraji LM., and Mink PJ. Egg consumption and CHD and stroke mortality: a prospective study of US adults. *Public Health Nutrition* 2011;14(2):261-270.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82(2):291-295.

Sen CK., Khanna S., Roy S., Packer L. Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60(c-Src) kinase activation and death of HT4 neuronal cells. *J Biol Chem* 2000;275:13049–13055.

Serbinova EA. and Packer L. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Methods Enzymol* 1994;234:354–366.

Serra-Majem L., Roman B. and Estruch R. Scientific evidence of interventions using the Mediterranean Diet: A systematic review. *Nutr Rev* 2006;64(2):S27–S47.

Serbinova E., Kagan V., Han D. and Packer L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Free Radic Biol Med* 1991;10:263–275.

Shepherd J., Packard CJ., Grundy SM., Yeshurun Y., Gotto AM. and Taunton OD. Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man. *J Lipid Res.* 1980;21:91-99.

Shibata N., Arita M., Misaki Y., et al. Supernatant protein factor, which stimulates the conversion of squalene to lanosterol, is a cytosolic squalene transfer protein and enhances cholesterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2244–2249.

Slimani N., Fahey M., Welch AA., Wirfalt E., Stripp C., Bergstrom E., Linseisen J., Schulze MB., Bamia C., et al. Diversity of dietary patterns observed in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) project. *Public Health Nutr* 2002;5:1311–1328

Sohlberg S. and Andersson G. Extracting a maximum of useful information from statistical research data. *Scand J Psychol* 2005;46:67-77.

Song BL. and Debose-Boyd RA. Insig-dependent ubiquitination and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase stimulated by delta - and gamma - tocotrienols. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25054-25061.

Sontag TJ. and Parker RS. Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism: a novel mechanism of regulation of vitamin E status. *J Biol Chem* 2002;277:25290-25296.

Stanner S. Cardiovascular disease: Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors. British Nutrition Foundation, Londres, Inglaterra. 2005, 380 p.

Stein O. and Stein Y. Smooth muscle cells and atherosclerosis. *Curr Opin in Lipidol* 1995;8:269-274.

Sterne JA. and Smith GA.. Sifting the evidence: What's wrong with significance tests?. *Br Med J* 2001;322:223-231.

Stern MH., Robeson CD., Weisler LD and Baxter JG. δ -tocopherol. I. Isolation from soybean oil and properties. *J Am Chem Soc* 1947;69:869-874.

Stephens NG., Parsons A., Schofield PM., Kelly F., Cheeseman K., Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347:781–786.

Stocker A., Zimmer S., Spycher SE. and Azzi A. Identification of a novel cytosolic tocopherol-binding protein: structure, specificity, and tissue distribution. *IUBMB Life* 1999;48(1):49-55.

Sundram K., Khor HT., Ong ASH. Effect of dietary palm oil and its fractions on rat plasma and high density lipoprotein lipids. *Lipids* 1990;25:187-193

Sundram K, Hayes KC, Siru OH. Dietary palmitic acid results in lower serum cholesterol than does a lauric-myristic acid combination in normolipemic humans. *Am J Clin Nutr* 1994;59:841–6.

Suzuki YJ., Tsuchiya M., Wassall SR, et al. Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol: implications to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry* 1993;32:10692–10699.

Tan DT., Khor HT., Low WH., Ali A. and Gapor A. Effect of a palm-oil-vitamin E concentrate on the serum and lipoprotein lipids in humans. *Am J Clin Nutr* 1991;53(4 Suppl):1027S–1030S.

The HOPE Study Investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 2000;342:154–160.

Theriault A., Wang Q., Gapor A. and Adeli K. Effect of γ -tocotrienol on apolipoprotein B synthesis, degradation, and secretion in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:704-712.

Theriault A. Tocotrienol: un potente antioxidante en el aceite de palma. *Palmas* 2000;21(2):394-407

Theriault A., Chao JT. and Gapor A. Tocotrienol is the most effective vitamin E for reducing endothelial expression of adhesion molecules and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis* 2002;160:21–30.

Tholstrup T., Hjerpsted J. and Raff M. Palm olein increases plasma cholesterol moderately compared with olive oil in healthy individuals. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1426-1432.

Tholstrup T., Hjerpsted J. and Raff M. Palm olein increases plasma cholesterol moderately compared with olive oil in healthy individuals. *FASEB J* 2012; 26:1015.2.

Thorburn D. Significance testing, interval estimation or Bayesian inference: Comments to “extracting a maximum useful information from statistical research data”. *Scand J Psychol* 2005;46:79-82.

Tomeo AC., Geller M., Watkins TR., Gapor A. and Bierenbaum ML. Antioxidant effect of tocotrienols in patients with hyperlipidemia and carotid stenosis. *Lipids* 1995;30:1179-1183.

Tosca LZ., West KL. and Fernandez ML. Grape Polyphenols Decrease Plasma Triglycerides and Cholesterol Accumulation in the Aorta of Ovariectomized Guinea Pigs. *J Nutr* 2003;133: 2268–2272.

Tosca LZ., Wood RJ., Greene C., West KL., Liu Y., Aggarwal D., Shachter NS., and Fernandez ML. Grape Polyphenols Exert a Cardioprotective Effect in Pre- and Postmenopausal Women by Lowering Plasma Lipids and Reducing Oxidative Stress. *J Nutr* 2005;135:1911–1917.

Traber MG. and Kayden HJ. Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1984;40:747-751.

Traber MG., Olivecrona T. and Kayden HJ. Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis in vitro. *J Clin Invest* 1985;75:1729-1734.

Traber MG., Lane JC., Lagmay N. and Kayden HJ. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids* 1992;27:657-663.

Traber MG., Burton GW., Hughes L., Ingold KU, et al. Discrimination between forms of vitamin E by humans without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1992a;33:1171-1182.

Traber MG and Sies H. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu Rev Nutr* 1996;16:321-347.

Traber MG., The ABC of vitamin E and beta-carotene absorption. *Am J Clin Nutr* 2004;80:3-4.

Traber MG. Vitamin E regulation. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21:223-227.

Truswell AS. Comparing palmolein with different predominantly monounsaturated oils: effect on plasma lipids. *International J Food Sci Nutr* 2000;51:S73–S77.

US Department of Agriculture, Human Nutrition Information Service: “Nationwide Food Consumption Survey, 1987–88. Individual Intakes, 3 Days.” Computer Tape PB 90 504044. Springfield, VA: National Technical Information Service, 1990.

Van Horn L., McCoin M., Kris-Etherton PM, et al. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *J Am Diet Assoc* 2008;108:287-331.

Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, et al. The Medi- RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr* 2005;82(5):964–971.

Vega-López S., Ausman LM, Jalbert SM, Erkkilä AT, and Lichtenstein AH. Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 54-62.

Vogel J. The Pathological Anatomy of the Human Body. Lea & Blanchard. Philadelphia. 1847;557 p.

Wada S., Satomi Y., Murakoshi M., Noguchi N., Yoshikawa T. and Nishino H. Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro. *Cancer Lett* 2005;229:181–191.

Waters DD., Alderman EL., Hsia J., Howard BV., Cobb FR., Rogers WJ., et al. Effects of hormone replacement therapy and antioxidant vitamin supplements on coronary atherosclerosis in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288:2432–2440.

Watkins T., Lenz P., Gapor A., Struck M., Tomeo A. and Bierenbaum M. Tocotrienol as a hypocholesterolemic and antioxidant agent in rats fed atherogenic diets. *Lipids* 1993;28:1113-1118.

Witztum J, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;88:1785-1792.

WHO. World Health Statistics. 2011 (consultada Mayo 22 de 2012, http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2011_Full.pdf)

Xu WL., Liu JR., Liu HK., Qi GY., Sun XR., Sun WG, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by gamma-tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells. *Nutrition* 2009;25:555–566.

Yang Z., Xiao H., Jin H., Koo PT., Tsang DJ. and Yang CS. Synergistic actions of atorvastatin with gamma-tocotrienol and celecoxib against human colon cancer HT29 and HCT116 cells. *Int J Cancer* 2010;126:852–863.

Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals* 2004;38:246–256.

Yap WN., Chang PN., Han HY., Lee DT., Ling MT., Wong YC., et al. Gamma-tocotrienol suppresses prostate cancer cell proliferation and invasion through multiple-signalling pathways. *Br J Cancer* 2008;99:1832–1841.

Yli-Jokipii K., Kallio H., Schwab U., Mykkänen H., Kurvinen J, Savolainen MJ and Tahvonon R. Effects of palm oil and transesterified palm oil on chylomicron and VLDL triacylglycerol structures and postprandial lipid response. *J Lipid Res* 2001; 42: 1618-1625.

Yu W., Simmons-Menchaca M., Gapor A., Sanders BG. and Kline K. Induction of apoptosis in human breast cancer cell by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer* 1999;33:26-32.

Zern TL, West KL., and Fernandez ML. Grape Polyphenols Decrease Plasma Triglycerides and Cholesterol Accumulation in the Aorta of Ovariectomized Guinea Pigs. *J Nutr* 2003; 133: 2268-2272.

Zern TL., Wood RJ., Greene C., West KL., Liu Y., Aggarwal D., et al. Grape Polyphenols Exert a Cardioprotective Effect in Pre- and Postmenopausal Women by Lowering Plasma Lipids and Reducing Oxidative Stress. *J Nutr* 2005;135:1911-1917.

Zhou C., Tabb MM., Sadatrafiei A., Grün F. and Blumberg B. Tocotrienols activate the steroid and xenobiotic receptor, SXR and selectively regulate expression of its target genes. *Drug Met Disposition* 2004;32(10):1075-1082.

Zingg J-M. Modulation of signal transduction by vitamin E. *Mol Aspects Med* 2007;28(5-6):481-506.

ANEXOS

INTERNATIONAL STANDARD

ISO 5509

Second edition
2000-04-01

Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids

*Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation des esters
méthyliques d'acides gras*



Reference number
ISO 5509:2000(E)

© ISO 2000

PDF disclaimer

This PDF file may contain embedded typefaces. In accordance with Adobe's licensing policy, this file may be printed or viewed but shall not be edited unless the typefaces which are embedded are licensed to and installed on the computer performing the editing. In downloading this file, parties accept therein the responsibility of not infringing Adobe's licensing policy. The ISO Central Secretariat accepts no liability in this area.

Adobe is a trademark of Adobe Systems Incorporated.

Details of the software products used to create this PDF file can be found in the General Info relative to the file; the PDF-creation parameters were optimized for printing. Every care has been taken to ensure that the file is suitable for use by ISO member bodies. In the unlikely event that a problem relating to it is found, please inform the Central Secretariat at the address given below.

© ISO 2000

All rights reserved. Unless otherwise specified, no part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and microfilm, without permission in writing from either ISO at the address below or ISO's member body in the country of the requester.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 734 10 79
E-mail copyright@iso.ch
Web www.iso.ch

Printed in Switzerland

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

International Standards are drafted in accordance with the rules given in the ISO/IEC Directives, Part 3.

Draft International Standards adopted by the technical committees are circulated to the member bodies for voting. Publication as an International Standard requires approval by at least 75 % of the member bodies casting a vote.

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this International Standard may be the subject of patent rights. ISO shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights.

International Standard ISO 5509 was prepared by Technical Committee ISO/TC 34, *Agricultural food products*, Subcommittee SC 11, *Animal and vegetable fats and oils*.

This second edition cancels and replaces the first edition (ISO 5509:1978), which has been technically revised.

Annex A forms a normative part of this International Standard. Annex B is for information only.

Introduction

ISO 5509 contains three different procedures to prepare methyl esters.

The general method is the BF_3 method which is applicable to oils and fats and free fatty acids but which is less applicable to caproic acid (C6) and not applicable to butyric acid (C4). The application field is GLC, TLC and IR.

Two alternative methods not involving BF_3 are given using trimethylsulfonium hydroxide and potassium hydroxide in methanol. Both methods are rapid methods for GLC analysis only.

The second method (trimethylsulfonium hydroxide method), which is for GLC analyses only, can be used for all fats and oils including milk fat and milk fat containing blends. In the case of short fatty acids (C4 to C8) the use of an internal standard is recommended.

The third method (trans-esterification method) can be used for neutral oils and fats, and can also be used for the quantitative analysis of oils and fats with short-chain fatty acids down to butyric acid (C4). For the determination of C4 and/or C6, only the internal standard method is maintained.

The principal new approach in this revision is the use of isooctane as solvent instead of hexane or pentane. This is based on references [1] and [2], which showed better results especially for the BF_3 method when using isooctane.

Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids

1 Scope

This International Standard specifies methods of preparing the methyl esters of fatty acids.

It includes methods for preparing fatty acid methyl esters from animal and vegetable fats and oils, fatty acids and soaps. To cover different requirements, three methylation methods are specified, as follows:

- a) boron trifluoride (BF₃) method (see clause 3);
- b) trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) method (see clause 4);
- c) trans-esterification method (see clause 5).

Methyl esters so produced are used in various analytical procedures requiring such derivatives, for example gas-liquid chromatography (GLC), thin-layer chromatography (TLC) and infrared spectrometry (IR).

2 Normative references

The following normative documents contain provisions which, through reference in this text, constitute provisions of this International Standard. For dated references, subsequent amendments to, or revisions of, any of these publications do not apply. However, parties to agreements based on this International Standard are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent editions of the normative documents indicated below. For undated references, the latest edition of the normative document referred to applies. Members of ISO and IEC maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 661, *Animal and vegetable fats and oils — Preparation of test sample*.

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*.

3 General method using boron trifluoride

WARNING — The method described involves the use of potentially hazardous reagents. Normal precautions shall be taken for eye protection and for protection from the dangers of corrosive chemical burns.

Boron trifluoride is poisonous. For this reason, it is not recommended that the analyst prepare the methanolic solution of boron trifluoride from methanol and boron trifluoride. (See A.1 in annex A.)

3.1 Principle

The glycerides are saponified with methanolic sodium hydroxide. The soaps are converted into methyl esters by reaction with a boron trifluoride/methanol complex.

For analysis of pure fatty acids and soaps, saponification with sodium hydroxide is not necessary and esters can be prepared directly by reaction with boron trifluoride.

3.2 Applicability

This method is to be preferred for most oils, fats and derivatives (fatty acids, soaps) with the exception of milk fats and of fats containing fatty acids with specific groups.

During esterification, compounds containing the following configurations may be totally or partially decomposed:

- keto, epoxy, hydroxy, hydroperoxy groupings;
- cyclopropyl and cyclopropenyl groups;
- acetylenic fatty acids.

If the fatty matter contains such compounds in only very small amounts (e.g. cottonseed oil), the method can be applied; otherwise the method described in clause 4 or 5 should be followed.

For gas chromatography, the optimum recovery of the methyl esters from the reaction mixture is obtained by using isooctane. However, only about 75 % of the methyl caproate (C6) present will be recovered.

3.3 Reagents

Use only reagents of recognized analytical grade.

3.3.1 Water, complying with grade 3 of ISO 3696.

3.3.2 Sodium hydroxide, methanolic solution, approximately 0,5 mol/l.

Dissolve 2 g of sodium hydroxide in 100 ml of methanol containing not more than 0,5 % (mass fraction) of water. If the solution has to be stored for a considerable time, a small amount of white precipitate of sodium carbonate may be formed; this has no effect on the preparation of the methyl esters.

3.3.3 Boron trifluoride (BF₃), methanolic solution, 12 % to 15 % (mass fraction)¹. See A.1.

3.3.4 Isooctane (2,2,4-trimethylpentane), of chromatographic quality. See A.2.

WARNING – Isooctane is flammable and a fire risk. Explosive limits in air are 1,1 % to 6,0 % (volume fraction). It is toxic by ingestion and inhalation. Use a properly operating fume hood when working with this solvent.

3.3.5 Sodium chloride, saturated aqueous solution.

3.3.6 Sodium sulfate, anhydrous.

3.3.7 Nitrogen, having an oxygen content less than 5 mg/kg.

3.3.8 Hexane, of chromatographic quality, for dry methyl esters only. See A.2. Light petroleum, boiling range 40 °C to 60 °C, redistilled and residue-free, with a bromine value less than 1, may be used.

3.3.9 Methyl red, 1 g/l solution in 60 % (volume fraction) ethanol.

¹) 14 %, 20 % (Merck No. 8.01663) and 50 % solutions are available commercially. This information is given for the convenience of users of this International Standard and does not constitute an endorsement by ISO of these products.

3.4 Apparatus

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

- 3.4.1 Flask**, of capacity 50 ml or 100 ml, with ground neck and fitted with a ground glass stopper.
- 3.4.2 Reflux condenser**, of 20 cm to 30 cm effective length, with a ground joint to fit the flask (3.4.1).
- 3.4.3 Boiling aid**, fat-free.
- 3.4.4 Graduated or automatic pipette**, of capacity at least 10 ml, and fitted with a rubber bulb.
- 3.4.5 Vial**, of capacity 4 ml, with screw cap.
- 3.4.6 Separating funnels**, of capacity 250 ml, for dry methyl esters only.
- 3.4.7 Rotary evaporator**.
- 3.4.8 Analytical balance**, capable of weighing to the nearest 0,001 g.

3.5 Preparation of test sample

The test sample shall be liquid, dry and clear. Proceed in accordance with ISO 661, but heat the sample to just above the melting point.

3.6 Procedure

WARNING — Because of the toxic character of boron trifluoride, perform the methylation under a ventilated hood. It is essential to wash all glassware with water immediately after use.

3.6.1 Test portion

Use Table 1 to select the appropriate size of flask and quantities of reagents and solvents required to methylate the amount of test portion chosen.

Table 1

Purpose	Test portion mg	Flask (3.4.1) ml	NaOH solution (3.3.2) ml	BF ₃ solution (3.3.3) ml	Solvent (3.3.4) or (3.3.8) ml
GLC	100 to 250	50	4	5	1 to 3
	250 to 500	50	6	7	2 to 5
IR/TLC	500 to 750	100	8	9	4 to 8
	750 to 1 000	100	10	12	7 to 10

3.6.2 Saponification

3.6.2.1 For fats and oils, start the method at 3.6.2.2.

For fatty acids and soaps, start the method at 3.6.2.3.

3.6.2.2 Introduce the test portion into the appropriate flask. See Table 1 and annex A. Add the appropriate amount (see Table 1) of the methanolic sodium hydroxide solution (3.3.2) and a boiling aid (3.4.3). Fit the condenser (3.4.2) to the flask.

If the fatty acids contain more than two double bonds, remove the air from the flask by flushing the flask with dry nitrogen (3.3.7) immediately prior to the reflux for a few minutes.

Boil under reflux until the droplets of fat disappear, swirling the flask gently every 30 s to 1 min to prevent a solid ring of sodium hydroxide forming around the walls of the flask. This usually takes 5 min to 10 min, but in certain exceptional cases it may take longer. See A.3 and A.4. Add the appropriate amount (see Table 1) of the methanolic boron trifluoride solution (3.3.3) through the top of the condenser.

Proceed in accordance with either 3.6.3 or 3.6.4.

3.6.2.3 Introduce the test portion into the appropriate flask (see Table 1). Add the appropriate amount (see Table 1) of the methanolic boron trifluoride solution (3.3.3) into the flask. Fit the condenser (3.4.2) to the flask.

Proceed in accordance with either 3.6.3 or 3.6.4.

3.6.3 Preparation of the methyl esters in isooctane solution (mainly for gas liquid chromatography purposes)

3.6.3.1 Continue boiling for 3 min. In the case of oils with long-chain fatty acids, such as fish oils, continue boiling for 30 min.

3.6.3.2 Add the appropriate amount (see Table 1) of isooctane (3.3.4) to the boiling mixture through the top of the condenser.

3.6.3.3 Remove the flask from the heat source and remove the reflux condenser. IMMEDIATELY, without allowing the flask to cool, add 20 ml of sodium chloride solution (3.3.5). Stopper the flask and shake it vigorously for at least 15 s.

3.6.3.4 Add more of the saturated sodium chloride solution (3.3.5) to bring the liquid level of the mixture into the neck of the flask. Allow the two phases to separate.

3.6.3.5 Transfer 1 ml to 2 ml of the upper isooctane layer into a 4 ml vial (3.4.5) and add a small amount of anhydrous sodium sulfate (3.3.6) to remove any traces of water.

The isooctane solution thus obtained may be injected as follows:

- a) directly onto a packed column for gas-liquid chromatography (see A.5);
- b) after appropriate dilution with isooctane for capillary column systems prior to the injection (see A.6);
- c) after dilution with a lower boiling solvent such as heptane for the special case of capillary on-column injection.

3.6.4 Preparation of dry methyl esters (for TLC or IR spectroscopy)

3.6.4.1 Continue boiling for 3 min.

3.6.4.2 Add the appropriate amount (see Table 1) of hexane (3.3.8) to the boiling mixture through the top of the condenser.

3.6.4.3 Remove the flask from the heat source and remove the reflux condenser. IMMEDIATELY, without allowing the flask to cool, add 20 ml sodium chloride solution (3.3.5). Stopper the flask and shake it vigorously for at least 15 s.

3.6.4.4 Transfer the saline solution and hexane layer to a 250 ml separation funnel (3.4.6). Add about 30 ml of the saturated sodium chloride solution. Allow the two phases to separate. Retain the hexane solution. Extract the saline solution twice with 50 ml portions of hexane (3.3.8).

3.6.4.5 Combine the hexane solution and the two extracts and wash them with 20 ml portions of water (3.3.1) until no free acid is obtained, using the methyl red solution (3.3.9) as indicator.

Dry over anhydrous sodium sulfate (3.3.6). Filter the solution and evaporate the solvent cautiously on a water bath under a stream of nitrogen (3.3.7) or use a rotary evaporator (3.4.7).

If the remaining portion contains a considerable amount of short-chain methyl esters (C6 to C10), a substantial loss of these can hardly be avoided. For test portions less than 500 mg, it is preferable to reduce proportionally the volumes of sodium chloride solution, solvent and water. See A.6.

4 Trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) method

WARNING – The method described involves the use of potentially hazardous reagents. Normal precautions shall be taken for eye protection and for protection from the dangers of corrosive chemical burns. Trimethylsulfonium hydroxide may be poisonous.

4.1 Principle

The test sample is dissolved in *t*-butyl methyl ether and the methyl esters are prepared by trans-esterification with trimethylsulfonium hydroxide (TMSH). Immediate injection in the gas chromatograph at an injector temperature of above 250 °C. In the presence of short-chain fatty acids (4 to 8 carbon atoms), the use of valeric acid methyl ester is recommended as an internal standard (see 4.2).

4.2 Applicability

This rapid method is only for the preparation of methyl esters for GLC. It is applicable to all fats and oils including milk fat and blends containing milk fat. Isomerization of unsaturated fatty acids has not been observed.

The method can be applied to compounds containing the chemical configurations listed in 3.2, but it is not known whether an entire conversion into methyl esters will take place. Also free fatty acids are only esterified by about 70 % to 80 %.

Lipids containing hydroxy groups are partially converted to the corresponding O-methyl ether derivatives which may interfere with fatty acid methyl esters (FAME) in GLC separation. Therefore the TMSH derivatization method is not recommended without limitation for lipids containing hydroxy groups. On the other hand it may be of some diagnostic value for the analysis of such lipids by GLC/mass spectrometry.

The TMSH procedure cannot be applied when cold-on-column injection is used in GLC analysis. Moreover the use of polar stationary phases (cyanopropyl siloxanes) is not recommended.

For the determination of short-chain fatty acids (C4 to C8), the use of valeric acid methyl ester (methyl pentanoate) as an internal standard is recommended, provided there is no valeric acid in the sample.

4.3 Reagents

Use only reagents of recognized analytical grade.

4.3.1 *t*-Butyl methyl ether.

4.3.2 Trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)²⁾, methanolic solution, 0,2 mol/l.

The solution remains stable for at least 2 months if stored at 4 °C in small quantities in a closed tube.

NOTE Reference [3] gives a method of preparation.

4.3.3 Internal standard stock solution, for butyric and/or caproic acid determination only.

Weigh, to the nearest 0,1 mg, about 250 mg of valeric acid methyl ester into a 50 ml volumetric flask. Use isooctane to dissolve the sample and to dilute to the mark.

4.3.4 Internal standard reference solution, for butyric and/or caproic acid determination only.

Add 10 ml of stock solution (4.3.3) to a 100 ml volumetric flask and dilute to the mark with isooctane. Calculate the concentration of this reference solution. See A.8.

2) Trimethylsulfonium hydroxide (Article 70152) is available from Macherey-Nagel GmbH Co., D-52313 Düren. This information is given for the convenience of users of this International Standard and does not constitute an endorsement by ISO of this product.

4.3.5 Petroleum ether.

4.3.6 Sodium sulfate, anhydrous.

4.4 Apparatus

Usual laboratory equipment and, in particular, the following.

4.4.1 Test tubes, of capacity 2 ml, with ground glass stoppers (autosampler vials).

4.4.2 Graduated pipettes, of capacity 1 000 μl .

4.4.3 Volumetric flasks, of capacities 50 ml and 100 ml.

4.4.4 Fluted filter paper.

4.4.5 Rotary evaporator.

4.5 Preparation of test sample

The test sample shall be liquid, dry and clear. Proceed in accordance with ISO 661, but heat the sample to just above the melting point.

4.6 Procedure

4.6.1 Test portion

Weigh into the test tube (4.4.1) $10 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ of the test portion.

In the case of samples with higher water content, use a larger test portion.

Melt solid samples carefully at a temperature of approx. $10 \text{ }^\circ\text{C}$ above their melting point and mix. Avoid overheating.

Dissolve samples containing water in petroleum ether (4.3.5) and dry them for 30 min by addition of anhydrous sodium sulfate (4.3.6). Remove the drying agent by filtration through a fluted filter paper and wash the residue carefully with petroleum ether. Remove the solvent with the aid of a rotary evaporator (4.4.5).

4.6.2 Preparation of methyl esters

4.6.2.1 Using a pipette (4.4.2), add 500 μl *t*-butyl methyl ether and dissolve the sample, gently warming if necessary.

For butyric and/or caproic acid determination, add 500 μl of the internal standard reference solution (4.3.4) instead of 500 μl of the *t*-butyl methyl ether.

4.6.2.2 To this solution add, using a pipette (4.4.2), 250 μl of TMSH solution (4.3.2) and shake vigorously for about 30 s. See A.7.

4.6.2.3 The obtained solution (4.6.2.2) is ready for injection in the gas chromatograph. As the methyl esters of free fatty acids are only formed during injection, an injector temperature of at least $250 \text{ }^\circ\text{C}$ is required. See A.2 and A.7.

If it is necessary to dilute the solution prior to injection, use a mixture of *t*-butyl methyl ether (4.3.1) and methanol (9+1) to avoid precipitation of TMSH.

5 Trans-esterification method

WARNING — The method described involves the use of potentially hazardous reagents. Normal precautions shall be taken for eye protection and for protection from the dangers of corrosive chemical burns. Methanolic potassium hydroxide solution is poisonous.

5.1 Principle

The glycerides are dissolved in isooctane and converted to methyl esters by trans-esterification with potassium hydroxide. After the reaction has finished, the potassium hydroxide is neutralized with sodium hydrogen sulfate to prevent saponification of the methyl esters.

5.2 Applicability

This rapid method is applicable to edible fats and oils containing fatty acids down to C₄, having a free fatty acids content (FFA) of not greater than 2 %, and for the determination of butyric acid (C₄) or caproic acid (C₆) by GLC by using an internal standard.

For samples with a higher FFA, an excess of potassium hydroxide should be used. As free fatty acids and soaps are not esterified by potassium hydroxide, the method can be used to obtain methyl esters of the glyceride part of the sample only.

The method can be applied to compounds containing the chemical configurations listed in 3.2 but it is not known whether an entire conversion into methyl esters will take place.

5.3 Reagents

Use only reagents of recognized analytical grade, unless otherwise specified.

5.3.1 Potassium hydroxide, methanolic solution, approximately 2 mol/l.

Since potassium hydroxide in practice contains about 15 % water, proceed as follows.

Dissolve with gentle heating, 13,1 g of potassium hydroxide in 100 ml of absolute methanol.

Add a quantity of anhydrous sodium sulfate to the solution to dry it. Filter to obtain a clear solution. If the solution has to be stored for a considerable time, a small amount of white precipitate of sodium carbonate may be formed; this has no effect on the preparation of the methyl esters when using the clear supernatant.

5.3.2 Isooctane (2,2,4-trimethylpentane), of chromatographic quality (see A.2).

5.3.3 Sodium hydrogen sulfate monohydrate.

5.3.4 Internal standard stock solution, for butyric and/or caproic acid determination only.

Weigh, to the nearest 0,1 mg, about 250 mg of valeric acid methyl ester (methyl pentanoate) into a 50 ml volumetric flask. Use isooctane (5.3.2) to dissolve the sample and to dilute to the mark.

5.3.5 Internal standard reference solution, for butyric and/or caproic acid determination only.

Add 10 ml of stock solution (5.3.4) to a 100 ml volumetric flask and dilute to the mark with isooctane (5.3.2). Calculate the concentration of this reference solution. See A.8.

5.4 Apparatus

Usual laboratory equipment, and in particular, the following.

- 5.4.1 **Test tube**, of capacity 5 ml, with ground glass stopper.
- 5.4.2 **Graduated pipette** or **dispenser**, of capacity 4 ml, and/or a **volumetric pipette** of capacity 4 ml.
- 5.4.3 **Pipette** or **automatic pipette**, of capacity 200 μ l.
- 5.4.4 **Vial**, of capacity 4 ml, with screw cap.
- 5.4.5 **Volumetric flasks**, of capacities 50 ml and 100 ml.

5.5 Preparation of test sample

The test sample shall be liquid, dry and clear. Proceed in accordance with ISO 661, but heat the sample to just above the melting point.

5.6 Procedure

5.6.1 Test portion

Weigh into the test tube (5.4.1) about 60 mg of the test portion. For butyric and/or caproic determination, weigh the test portion to the nearest 0,1 mg.

5.6.2 Preparation of methyl esters

5.6.2.1 Add with a pipette or dispenser (5.4.2), 4 ml of isooctane (5.3.2) and dissolve the sample, using gentle warming if necessary.

For butyric and/or caproic acid determination, use a volumetric pipette (5.4.2) to add 4,00 ml of reference solution (5.3.5) instead of isooctane.

5.6.2.2 Add, with a pipette (5.4.3), 200 μ l methanolic potassium hydroxide solution (5.3.1) and stopper the test tube. Shake the mixture vigorously for about 30 s. After an initial cloudiness due to the separation of glycerol, the reaction mixture will become clear.

5.6.2.3 Add about 1 g of sodium hydrogen sulfate monohydrate (5.3.3) to the solution and shake it vigorously to neutralize the potassium hydroxide.

5.6.2.4 After the salt has settled, decant the upper layer containing the methyl esters into the 4 ml vial (5.4.4).

The isooctane solution obtained will contain about 15 mg/ml of methyl esters and may be injected as follows:

- a) directly onto a packed column for gas-liquid chromatography (see A.5);
- b) after appropriate dilution with isooctane for capillary column systems prior to the injection (see A.6);
- c) after dilution with a lower boiling solvent such as heptane for the special case of capillary on-column injection.

6 Precision

Details of an interlaboratory test for comparison of the three different procedures to prepare methyl esters are summarized in annex B. Values for the repeatability and reproducibility were not calculated because these values depend not only on the preparation of the methyl esters but also on the columns used, the GLC conditions and GLC apparatus used.

Annex A (normative)

General analytical procedures

A.1 Preparation of BF_3

If it is absolutely essential to prepare the boron trifluoride methanolic solution, proceed as follows.

WARNING — Operate under a ventilated hood.

Weigh a 2 l flask containing 1 l of methanol. Cool it in a bath of ice-water. Keeping the flask in the bath, bubble BF_3 from a gas cylinder through the glass tube before immersing the latter in the methanol and until it is removed, in order to prevent any liquid from returning to the gas expansion system. The gas should not give off white fumes by escaping too quickly from the flask.

The reagent remains stable for 2 years if stored in a refrigerator.

A.2 Reagents

The reagents shall not produce peaks which interfere with those of the methyl esters of fatty acids during gas-liquid chromatography.

During gas-liquid chromatography of the methyl esters, certain reagents may produce unexpected peaks on the graph. Particularly during long storage, methanolic boron trifluoride generates components which interfere in the C20 to C22 acids region.

Consequently, any new batch of reagent or solvent should be checked by using it to prepare the methyl esters of pure oleic acid and chromatographing them. If any extra peaks appear, the reagent should be rejected.

A.3 Saponification

In the class of oils such as castor oils, which are soluble in methanol, no droplets of oil will be observed.

Therefore clarity of the solution is not proof of completion of the reaction.

A.4 Unsaponifiable matter

Unsaponifiable matter is not removed and, if it is present in substantial amounts, it may interfere with subsequent analysis. If this is the case, it is essential to supplement the method described with the following operations.

Dilute with distilled water the solution obtained after saponification and extract the unsaponifiable matter with diethyl ether, hexane or light petroleum. Acidify the aqueous solution and extract the fatty acids with isooctane or hexane. Prepare the methyl esters from these as described in 3.6.3 or 4.6.2.

A.5 Storage of methyl ester solution

The esters should preferably be analysed as soon as possible. If necessary, the isooctane solution containing the methyl esters may be stored under inert gas in a refrigerator.

For a longer period of storage, it is advisable to protect the methyl esters against autoxidation by adding to the solution an antioxidant in such a concentration as will not interfere with the subsequent analysis, for example a 0,05 g/l solution of BHT (2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol).

Methyl esters containing methyl butyrate shall only be stored in sealed ampoules, and it is essential to take special precautions to prevent any loss by evaporation during filling and sealing of the ampoules.

A.6 Storage of dry methyl esters

The dry methyl esters without solvent should be analysed without delay. If required, they may be kept for 24 h under an inert gas in a refrigerator, or for longer periods under vacuum in a sealed tube in a freezer.

A.7 TMSH method

Free fatty acids react with TMSH to form the corresponding salts, which are transformed to methyl esters and dimethylsulfide in the injector.

To prevent blocking, the capillary of the split vent should have a wide internal diameter. Otherwise it shall be cleaned by heating or flushing with solvent.

If valeric acid methyl ester is used as internal standard, it shall be added directly to the *t*-butyl methyl ether which is used to dissolve the sample (0,5 to 1,0 mg/ml).

A.8 Amount of methyl esters

If fatty acids are to be determined quantitatively by gas-liquid chromatography using internal standard(s), it is essential to weigh the test portion accurately; i.e. to the nearest 0,1 mg. The results will then be expressed as percentages by mass of the fatty acid content in the fat or oil. This does not agree with the results obtained by internal normalization.

Annex B (informative)

Results of interlaboratory test

An international collaborative study was carried out in 1995. In this test eight laboratories participated and eight samples with different content of free fatty acids were investigated. The aim of this test was to determine the application of the three different methods on the preparation of methyl esters from different kinds of fats and oils and on the content of free fatty acids. The results are listed in Tables B.1 to B.8. The minimum and maximum values are specified as well as the mean values and the standard deviations for the main fatty acids.

Table B.1 — Refined coconut oil (FFA = 0,03 %)

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 6:0	0,3	0,6	0,5	0,1
C 8:0	5,6	7,8	6,7	0,7
C 10:0	5,3	6,0	5,6	0,3
C 12:0	46,0	47,6	46,8	0,6
C 14:0	17,7	19,1	18,3	0,4
C 16:0	9,0	9,7	9,4	0,3
C 18:0	2,7	3,0	2,9	0,1
C 18:1	7,4	7,9	7,7	0,2
C 18:2	1,9	2,2	2,0	0,1
C 20:0	0,1	0,1	0,1	0,0
C 20:1	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	96,1	104,0	100,0	2,8
Trimethylsulfonium hydroxide method (6 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 6:0	0,5	0,7	0,6	0,1
C 8:0	7,1	8,5	7,8	0,5
C 10:0	5,6	6,3	6,0	0,2
C 12:0	45,8	47,6	46,7	0,7
C 14:0	16,4	17,9	17,4	0,5
C 16:0	8,5	9,4	8,9	0,3
C 18:0	2,5	3,2	2,8	0,2
C 18:1	6,8	7,9	7,4	0,4
C 18:2	1,6	2,6	2,1	0,3
C 20:0	0,1	0,3	0,2	0,1
C 20:1	0,0	0,5	0,1	0,2
Sum	95,0	104,9	100,0	3,7
Trans-esterification method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 6:0	0,5	0,7	0,6	0,1
C 8:0	6,5	9,3	7,4	0,6
C 10:0	5,4	7,1	5,9	0,3
C 12:0	45,8	52,0	46,8	0,7
C 14:0	16,7	18,6	18,0	0,4
C 16:0	6,6	9,5	9,1	0,3
C 18:0	1,7	3,0	2,8	0,2
C 18:1	4,7	8,0	7,5	0,3
C 18:2	1,1	2,2	1,9	0,1
C 20:0	0,0	0,1	0,1	0,0
C 20:1	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	89,1	110,7	100,0	3,1

Table B.2 — Refined soya bean oil (FFA = 0,06 %)

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 14:0	0,0	0,1	0,0	0,0
C 16:0	10,4	11,0	10,6	0,2
C 16:1	0,0	0,1	0,1	0,0
C 17:0	0,1	0,2	0,1	0,0
C 18:0	3,6	3,9	3,7	0,1
C 18:1	20,7	21,0	20,9	0,1
C 18:2	54,5	55,7	55,2	0,4
C 18:3	7,9	9,0	8,4	0,4
C 20:0	0,3	0,5	0,4	0,1
C 20:1	0,2	0,3	0,2	0,1
C 22:0	0,3	0,4	0,4	0,0
C 24:0	0,0	0,2	0,1	0,1
Sum	98,0	102,4	100,0	1,6
Trimethylsulfonium hydroxide method (6 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 14:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 16:0	10,5	11,3	10,7	0,3
C 16:1	0,0	0,1	0,1	0,1
C 17:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 18:0	3,6	3,8	3,7	0,1
C 18:1	20,6	22,5	21,2	0,7
C 18:2	53,4	55,7	54,8	0,9
C 18:3	7,7	9,0	8,3	0,4
C 20:0	0,3	0,6	0,4	0,1
C 20:1	0,1	0,7	0,3	0,2
C 22:0	0,3	0,5	0,4	0,1
C 24:0	0,0	0,2	0,1	0,1
Sum	96,5	104,8	100,0	3,1
Trans-esterification method (8 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 14:0	0,0	0,1	0,1	0,0
C 16:0	10,1	12,1	10,7	0,6
C 16:1	0,0	0,1	0,1	0,0
C 17:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 18:0	3,4	4,0	3,7	0,2
C 18:1	20,4	21,4	20,8	0,3
C 18:2	54,7	56,2	55,2	0,5
C 18:3	8,1	9,0	8,5	0,3
C 20:0	0,3	0,5	0,4	0,1
C 20:1	0,1	0,3	0,2	0,1
C 22:0	0,1	0,4	0,3	0,1
C 24:0	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	97,2	104,3	100,0	2,4

Table B.3 – Refined vegetable oil (FFA = 0,3 %)

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 8:0	0,4	0,6	0,5	0,1
C 10:0	0,4	0,5	0,5	0,0
C 12:0	5,0	5,5	5,3	0,1
C 14:0	3,1	3,2	3,2	0,0
C 16:0	49,2	50,6	50,0	0,5
C 17:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 18:0	37,8	39,6	38,9	0,6
C 18:1	0,1	0,8	0,5	0,3
C 18:2	0,0	0,2	0,1	0,1
C 20:0	0,6	0,7	0,6	0,0
C 22:0	0,3	0,4	0,3	0,1
C 24:0	0,0	0,1	0,1	0,1
Sum	96,9	102,4	100,0	1,9
Trimethylsulfonium hydroxide method (6 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 8:0	0,3	0,9	0,6	0,2
C 10:0	0,4	0,6	0,5	0,1
C 12:0	5,2	7,0	5,7	0,7
C 14:0	3,1	3,3	3,2	0,1
C 16:0	47,8	50,1	49,2	0,8
C 17:0	0,0	1,0	0,3	0,4
C 18:0	37,5	39,2	38,3	0,7
C 18:1	0,2	1,0	0,7	0,3
C 18:2	0,0	0,9	0,3	0,4
C 20:0	0,5	0,7	0,6	0,1
C 22:0	0,3	0,7	0,4	0,2
C 24:0	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	95,2	105,5	100,0	3,8
Trans-esterification method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 8:0	0,5	0,8	0,5	0,1
C 10:0	0,4	0,6	0,5	0,0
C 12:0	5,0	6,6	5,4	0,2
C 14:0	3,1	3,6	3,2	0,1
C 16:0	49,5	51,0	50,2	0,5
C 17:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 18:0	36,7	40,0	38,4	0,6
C 18:1	0,1	0,9	0,6	0,3
C 18:2	0,0	0,2	0,0	0,1
C 20:0	0,5	0,7	0,6	0,0
C 22:0	0,0	0,4	0,4	0,1
C 24:0	0,0	0,1	0,0	0,1
Sum	95,7	105,1	100,0	2,0

Table B.4 — Crude vegetable oil (FFA = 6,4 %)

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 12:0	0,1	0,2	0,1	0,0
C 14:0	1,0	1,1	1,0	0,0
C 16:0	43,3	45,1	43,8	0,6
C 16:1	0,0	0,2	0,1	0,1
C 17:0	0,1	0,1	0,1	0,0
C 18:0	4,5	4,8	4,7	0,1
C 18:1	38,4	39,3	38,9	0,4
C 18:2	9,9	10,8	10,3	0,3
C 18:3	0,2	0,5	0,3	0,1
C 20:0	0,4	0,5	0,4	0,0
C 20:1	0,1	0,2	0,1	0,1
C 22:0	0,0	0,1	0,1	0,0
Sum	97,9	102,9	100,0	1,7
Trimethylsulfonium hydroxide method (6 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 12:0	0,1	1,2	0,5	0,4
C 14:0	1,0	1,3	1,1	0,1
C 16:0	42,6	45,4	43,7	1,0
C 16:1	0,0	0,2	0,1	0,1
C 17:0	0,0	1,5	0,3	0,6
C 18:0	4,4	6,1	4,8	0,6
C 18:1	37,5	38,9	38,4	0,6
C 18:2	9,1	10,9	10,0	0,6
C 18:3	0,2	0,8	0,4	0,2
C 20:0	0,3	0,7	0,5	0,1
C 20:1	0,0	0,3	0,1	0,1
C 22:0	0,0	0,6	0,1	0,2
Sum	95,3	108,0	100,0	4,7
Trans-esterification method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 12:0	0,0	0,2	0,1	0,0
C 14:0	1,0	1,1	1,0	0,0
C 16:0	43,2	45,9	43,7	0,6
C 16:1	0,0	0,2	0,1	0,1
C 17:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 18:0	4,4	4,9	4,7	0,2
C 18:1	38,3	39,6	39,1	0,5
C 18:2	9,9	10,8	10,3	0,3
C 18:3	0,0	0,5	0,3	0,1
C 20:0	0,3	0,5	0,4	0,0
C 20:1	0,0	0,2	0,1	0,0
C 22:0	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	97,0	104,2	100,0	1,9

Table B.5 – Crude fish oil (FFA = 3,8 %)

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 12:0	0,0	1,0	0,2	0,4
C 14:0	7,0	8,7	7,9	0,6
C 14:1	0,0	1,0	0,2	0,3
C 15:0	0,0	0,5	0,4	0,2
C 16:0	15,9	20,4	18,2	1,6
C 16:1	8,2	9,7	8,9	0,5
C 16:2	0,0	2,1	0,8	1,1
C 16:3	0,0	1,7	0,7	0,9
C 16:4	0,0	2,6	1,0	1,3
C 17:0	0,0	1,6	0,8	0,6
C 17:1	0,0	1,6	0,3	0,6
C 18:0	3,3	6,0	4,1	0,9
C 18:1	12,1	13,6	13,0	0,5
C 18:2	1,3	2,4	1,7	0,4
C 18:3	0,6	2,0	1,1	0,4
C 18:4	0,0	3,2	2,2	1,0
C 20:0	0,3	0,9	0,4	0,2
C 20:1	0,0	2,3	1,8	0,8
C 20:2	0,0	0,4	0,2	0,2
C 20:3	0,0	1,3	0,4	0,5
C 20:4	0,8	1,6	1,2	0,4
C 20:5	17,0	18,9	18,2	0,7
C 22:0	0,0	0,9	0,2	0,3
C 22:1	2,1	2,6	2,4	0,2
C 22:2	0,0	0,8	0,2	0,4
C 22:4	0,0	0,8	0,3	0,3
C 22:5	2,2	2,5	2,3	0,1
C 22:6	9,8	10,9	10,4	0,3
C 24:0	0,0	0,3	0,1	0,1
C 24:1	0,0	0,5	0,3	0,3
Sum	80,8	123,0	100,0	16,1

Table B.5 — Crude fish oil (FFA = 3,8 %) (continued)

Trimethylsulfonium hydroxide method (6 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 12:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 14:0	7,4	9,6	8,6	0,9
C 14:1	0,0	0,6	0,2	0,2
C 15:0	0,0	0,6	0,4	0,2
C 16:0	16,2	21,5	18,8	1,9
C 16:1	8,5	10,2	9,2	0,6
C 16:2	0,0	1,8	0,8	0,9
C 16:3	0,0	1,8	0,6	0,9
C 16:4	0,0	2,1	0,4	0,9
C 17:0	0,4	1,6	0,9	0,5
C 17:1	0,0	1,2	0,2	0,5
C 18:0	3,6	6,5	4,3	1,1
C 18:1	12,9	14,3	13,6	0,5
C 18:2	1,3	1,7	1,5	0,2
C 18:3	0,6	2,4	1,3	0,8
C 18:4	0,0	2,6	2,0	1,0
C 20:0	0,2	1,9	0,6	0,6
C 20:1	0,0	2,6	1,8	0,9
C 20:2	0,0	0,7	0,2	0,3
C 20:3	0,0	0,8	0,2	0,3
C 20:4	0,8	1,4	0,9	0,2
C 20:5	16,7	19,4	17,8	1,3
C 22:0	0,0	0,8	0,2	0,3
C 22:1	0,0	3,0	1,9	1,1
C 22:2	0,0	2,3	0,7	0,9
C 22:4	0,0	0,7	0,3	0,3
C 22:5	1,9	2,6	2,3	0,3
C 22:6	8,9	11,1	9,9	0,9
C 24:0	0,0	0,3	0,1	0,1
C 24:1	0,0	0,9	0,2	0,4
Sum	79,4	127,4	100,0	19,1

Table B.5 — Crude fish oil (FFA = 3,8 %) (continued)

Trans-esterification method (8 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 12:0	0,0	0,1	0,1	0,1
C 14:0	6,5	10,7	8,5	1,4
C 14:1	0,0	0,3	0,2	0,1
C 15:0	0,0	0,6	0,4	0,2
C 16:0	15,9	20,8	18,5	1,8
C 16:1	7,6	10,3	9,0	0,9
C 16:2	0,0	2,2	0,6	0,9
C 16:3	0,0	1,8	0,7	0,8
C 16:4	0,0	2,6	0,6	1,2
C 17:0	0,4	1,8	1,1	0,6
C 17:1	0,0	2,7	0,7	1,0
C 18:0	0,0	4,3	3,3	1,4
C 18:1	12,6	13,7	13,2	0,4
C 18:2	1,3	2,7	1,7	0,5
C 18:3	0,6	1,7	0,9	0,4
C 18:4	0,0	3,4	2,3	1,0
C 20:0	0,2	0,8	0,4	0,2
C 20:1	0,0	2,4	1,7	0,8
C 20:2	0,0	0,6	0,2	0,2
C 20:3	0,0	0,9	0,2	0,4
C 20:4	0,8	1,6	1,1	0,3
C 20:5	16,6	20,2	18,8	1,1
C 22:0	0,0	0,7	0,1	0,2
C 22:1	0,0	2,8	1,8	1,0
C 22:2	0,0	2,3	0,5	0,8
C 22:4	0,0	0,8	0,3	0,4
C 22:5	1,9	2,6	2,3	0,2
C 22:6	8,9	15,3	10,7	1,9
C 24:0	0,0	0,3	0,0	0,1
C 24:1	0,0	0,8	0,2	0,3
Sum	73,3	132,1	100,0	20,6

Table B.6 – Oil/fatty acid blend (FFA = 70 %)

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 6:0	0,2	0,4	0,3	0,1
C 8:0	3,0	3,8	3,5	0,3
C 10:0	2,9	3,3	3,1	0,1
C 12:0	27,3	30,7	28,3	1,2
C 14:0	10,1	11,1	10,5	0,3
C 16:0	20,2	21,3	20,8	0,4
C 16:1	0,0	0,4	0,3	0,1
C 18:0	4,9	5,6	5,3	0,2
C 18:1	18,6	21,1	20,2	0,9
C 18:2	5,9	7,0	6,4	0,4
C 18:3	0,2	0,3	0,2	0,0
C 20:0	0,3	0,4	0,3	0,1
C 20:1	0,2	0,5	0,3	0,1
C 22:0	0,0	0,4	0,2	0,1
C 22:1	0,0	0,4	0,2	0,1
Sum	93,9	106,7	100,0	4,6
Trimethylsulfonium hydroxide method (5 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 6:0	0,0	0,6	0,5	0,1
C 8:0	0,3	4,8	4,4	0,4
C 10:0	2,1	3,7	3,5	0,2
C 12:0	10,0	30,2	29,0	0,9
C 14:0	7,7	10,6	10,1	0,4
C 16:0	19,8	26,4	20,5	0,6
C 16:1	0,0	0,3	0,1	0,2
C 18:0	5,0	9,1	5,4	0,5
C 18:1	15,3	32,7	18,5	2,0
C 18:2	5,5	10,2	6,4	0,6
C 18:3	0,2	0,6	0,4	0,2
C 20:0	0,3	0,8	0,4	0,1
C 20:1	0,2	0,5	0,3	0,1
C 22:0	0,0	0,5	0,3	0,1
C 22:1	0,0	0,8	0,3	0,3
Sum	66,4	131,8	100,0	6,7

Table B.7 – Lard

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 10:0	0,0	0,1	0,1	0,0
C 12:0	0,0	0,1	0,1	0,0
C 14:0	1,5	1,7	1,6	0,1
C 16:0	24,2	25,6	24,8	0,5
C 16:1	2,6	3,6	3,0	0,3
C 17:0	0,3	0,4	0,3	0,0
C 17:1	0,3	0,4	0,3	0,0
C 18:0	13,0	13,9	13,4	0,4
C 18:1	41,9	44,3	43,2	0,7
C 18:2	10,3	11,3	10,6	0,3
C 18:3	0,9	1,4	1,0	0,2
C 20:0	0,2	0,8	0,3	0,2
C 20:1	0,5	1,1	0,9	0,2
C 20:2	0,0	0,5	0,4	0,2
C 22:0	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	95,7	105,3	100,0	3,3
Trimethylsulfonium hydroxide method (6 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 10:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 12:0	0,0	1,5	0,3	0,6
C 14:0	1,5	1,8	1,6	0,1
C 16:0	22,1	25,4	24,2	1,2
C 16:1	2,6	3,3	3,0	0,2
C 17:0	0,3	0,5	0,4	0,1
C 17:1	0,2	0,5	0,3	0,1
C 18:0	12,6	13,7	13,3	0,4
C 18:1	41,7	44,9	43,2	1,1
C 18:2	9,8	11,5	10,5	0,6
C 18:3	0,8	2,0	1,2	0,5
C 20:0	0,2	0,8	0,4	0,2
C 20:1	0,2	1,6	1,0	0,5
C 20:2	0,2	0,6	0,5	0,2
C 22:0	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	92,3	108,4	100,0	6,0

Table B.7 — Lard (continued)

Trans-esterification method (8 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 10:0	0,0	0,1	0,1	0,1
C 12:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 14:0	1,5	1,6	1,6	0,1
C 16:0	23,6	25,4	24,6	0,7
C 16:1	2,6	3,4	3,0	0,3
C 17:0	0,3	0,4	0,3	0,0
C 17:1	0,2	0,4	0,3	0,1
C 18:0	12,8	13,7	13,2	0,3
C 18:1	42,9	44,3	43,5	0,5
C 18:2	10,3	11,2	10,7	0,3
C 18:3	0,8	1,5	1,1	0,3
C 20:0	0,2	0,8	0,4	0,3
C 20:1	0,6	1,2	0,9	0,2
C 20:2	0,0	0,5	0,3	0,2
C 22:0	0,0	0,1	0,0	0,0
Sum	95,9	104,7	100,0	3,5

Table B.8 — Cacao butter/milk fat blend (9 : 1)

Boron trifluoride method (7 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 4:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 6:0	0,1	0,2	0,2	0,1
C 8:0	0,1	0,1	0,1	0,0
C 10:0	0,2	0,3	0,2	0,1
C 12:0	0,3	0,4	0,3	0,0
C 14:0	1,1	1,6	1,2	0,2
C 14:1	0,0	0,1	0,1	0,0
C 15:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 16:0	25,5	28,3	26,3	0,9
C 16:1	0,3	0,6	0,4	0,1
C 17:0	0,2	0,3	0,3	0,0
C 18:0	31,5	33,9	33,1	0,8
C 18:1	32,6	33,7	33,2	0,4
C 18:2	2,8	3,5	3,0	0,2
C 18:3	0,2	0,3	0,2	0,0
C 20:0	0,8	1,0	0,9	0,1
C 20:1	0,0	0,1	0,1	0,0
C 22:0	0,0	0,2	0,1	0,1
Sum	95,7	105,0	100,0	3,3
Trimethylsulfonium hydroxide method (6 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 4:0	0,0	0,4	0,2	0,2
C 6:0	0,2	0,4	0,3	0,1
C 8:0	0,0	0,4	0,2	0,2
C 10:0	0,3	0,4	0,3	0,0
C 12:0	0,3	0,6	0,4	0,1
C 14:0	1,1	1,8	1,3	0,2
C 14:1	0,0	0,2	0,1	0,1
C 15:0	0,0	0,8	0,3	0,3
C 16:0	25,4	27,3	26,2	0,6
C 16:1	0,3	0,7	0,5	0,1
C 17:0	0,3	0,3	0,3	0,0
C 18:0	28,7	33,7	32,3	1,9
C 18:1	31,8	33,1	32,7	0,5
C 18:2	2,8	5,3	3,5	1,0
C 18:3	0,2	0,5	0,3	0,1
C 20:0	0,9	1,3	1,0	0,2
C 20:1	0,0	0,1	0,1	0,1
C 22:0	0,0	0,3	0,2	0,1
Sum	92,3	107,6	100,0	5,8

Table B.8 — Cacao butter/milk fat blend (9 : 1) (continued)

Trans-esterification method (8 laboratories)				
FAME	min.	max.	Mean	SD
C 4:0	0,0	0,4	0,2	0,2
C 6:0	0,1	0,3	0,2	0,1
C 8:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 10:0	0,2	0,4	0,3	0,1
C 12:0	0,3	0,7	0,4	0,1
C 14:0	1,1	1,7	1,2	0,2
C 14:1	0,0	0,2	0,1	0,1
C 15:0	0,0	0,2	0,1	0,1
C 16:0	25,5	27,9	26,4	0,8
C 16:1	0,3	0,7	0,4	0,1
C 17:0	0,0	0,4	0,3	0,1
C 18:0	31,4	33,8	32,9	0,8
C 18:1	32,4	33,5	33,2	0,4
C 18:2	2,7	3,6	2,9	0,3
C 18:3	0,0	0,3	0,2	0,1
C 20:0	0,0	1,1	0,8	0,3
C 20:1	0,0	0,1	0,0	0,0
C 22:0	0,0	0,7	0,2	0,2
Sum	93,9	106,4	100,0	4,2

Bibliography

- [1] BANNON, CRASKE *et al.* *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1985, p. 150.
- [2] BANNON, CRASKE *et al.* *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1987, p. 1413.
- [3] SCHULTE and WEBER. *Fat Sci. Technol.*, **91**, 1989, p. 181.

© ISO 2000

ICS 67.200.10

Price based on 24 pages

© ISO 2000 – All rights reserved

INTERNATIONAL STANDARD

ISO
5508

Second edition
1990-09-15

Animal and vegetable fats and oils — Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids

*Corps gras d'origines animale et végétale — Analyse par
chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras*



Reference number
ISO 5508:1990(E)

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

Draft International Standards adopted by the technical committees are circulated to the member bodies for voting. Publication as an International Standard requires approval by at least 75 % of the member bodies casting a vote.

International Standard ISO 5508 was prepared by Technical Committee ISO/TC 34, *Agricultural food products*.

This second edition cancels and replaces the first edition (ISO 5508:1978), of which it constitutes a technical revision.

© ISO 1990

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and microfilm, without permission in writing from the publisher.

International Organization for Standardization
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Switzerland

Printed in Switzerland

Animal and vegetable fats and oils — Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids

1 Scope

This International Standard gives general guidance for the application of gas chromatography, using packed or capillary columns, to determine the qualitative and quantitative composition of a mixture of fatty acid methyl esters obtained in accordance with the method specified in ISO 5509.

The method is not applicable to polymerized fatty acids.

2 Normative reference

The following standard contains provisions which, through reference in this text, constitute provisions of this International Standard. At the time of publication, the edition indicated was valid. All standards are subject to revision, and parties to agreements based on this International Standard are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent edition of the standard indicated below. Members of IEC and ISO maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 5509:1978, *Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids*.

3 Reagents

3.1 Carrier gas

Inert gas (nitrogen, helium, argon, hydrogen, etc.), thoroughly dried and with an oxygen content of less than 10 mg/kg.

NOTE 1 Hydrogen, which is used as a carrier gas only with capillary columns, can double the speed of analysis but is hazardous. Safety devices are available.

3.2 Auxiliary gases

3.2.1 Hydrogen (purity $\geq 99,9\%$), free from organic impurities.

3.2.2 Air or oxygen, free from organic impurities.

3.3 Reference standard

A mixture of methyl esters of pure fatty acids, or the methyl esters of a fat of known composition, preferably similar to that of the fatty matter to be analysed.

Care shall be taken to prevent the oxidation of polyunsaturated fatty acids.

4 Apparatus

The instructions given relate to the usual equipment used for gas chromatography, employing packed and/or capillary columns and a flame-ionization detector. Any apparatus giving the efficiency and resolution specified in 5.1.2 is suitable.

4.1 Gas chromatograph.

The gas chromatograph shall comprise the following elements.

4.1.1 Injection system.

Use an injection system either

- a) with packed columns, having the least dead-space possible (in this case the injection system shall be capable of being heated to a temperature 20 °C to 50 °C higher than that of the column), or
- b) with capillary columns, in which case the injection system shall be specially designed for use with such columns. It may be of the split type or it may be of the splitless or column injector type.

NOTE 2 In the absence of fatty acids with less than 16 carbon atoms, a moving needle injector may be used.

4.1.2 Oven.

The oven shall be capable of heating the column to a temperature of at least 260 °C and of maintaining the desired temperature to within 1 °C with a packed column and within 0,1 °C with a capillary column. The last requirement is particularly important when a fused silica tube is used.

The use of temperature-programmed heating is recommended in all cases, and in particular for fatty acids with less than 16 carbon atoms.

4.1.3 Packed column.

4.1.3.1 Column, constructed of a material inert to the substances to be analysed (i.e. glass or stainless steel) having the following dimensions.

- a) Length: 1 m to 3 m. A relatively short column should be used when long-chain fatty acids (above C₂₀) are present. When analysing acids with 4 or 6 carbon atoms, it is recommended that a column 2 m in length is used.
- b) Internal diameter: 2 mm to 4 mm.

NOTES

3 If polyunsaturated components with more than three double bonds are present, they may be decomposed in a stainless steel column.

4 A system with packed twin columns may be used.

4.1.3.2 Packing, comprising the following elements.

- a) Support: Acid-washed and silanized diatomaceous earth, or other suitable inert support with a narrow range of grain size (25 µm range between the limits 125 µm to 200 µm), the average grain size being related to the internal diameter and length of the column.
- b) Stationary phase: Polyester type of polar liquid (e.g. diethylene glycol polysuccinate, butanediol polysuccinate, ethyleneglycol polyadipate, etc.), cyanosilicones or any other liquid permitting the chromatographic separation required (see clause 5). The stationary phase should amount to 5 % (m/m) to 20 % (m/m) of the packing. A non-polar stationary phase can be used for certain separations.

4.1.3.3 Conditioning of the column.

With the column disconnected, if possible, from the detector, gradually heat the oven to 185 °C and pass a current of inert gas through the freshly prepared column at a rate of 20 ml/min to 60 ml/min for at least 16 h at this temperature, and for a further 2 h at 195 °C.

4.1.4 Capillary column.

4.1.4.1 Tube, made of a material inert to the substances to be analysed (usually glass or fused silica). The internal diameter shall be between 0,2 mm and 0,8 mm. The internal surface shall undergo an appropriate treatment (e.g. surface preparation, inactivation) before receiving the stationary phase coating. A length of 25 m is sufficient in most cases.

4.1.4.2 Stationary phase, usually of the type polyglycol [poly(ethylene glycol) 20 000], polyester (butanediol polysuccinate) or polar polysiloxane (cyanosilicones). Bonded (cross-linked) columns are suitable.

NOTE 5 There is a risk of polar polysiloxanes giving rise to difficulties in the identification and separation of linolenic acid and C₂₀ acids.

The coatings shall be thin, i.e. 0,1 µm to 0,2 µm.

4.1.4.3 Assembly and conditioning of the column.

Observe the normal precautions for assembling capillary columns, i.e. arrangement of the column in the oven (support), choice and assembly of joints (leak tightness), positioning of the ends of the column in the injector and the detector (reduction of dead-spaces). Place the column under a flow of carrier gas [e.g. 0,3 bar (30 kPa) for a column of length 25 mm and internal diameter 0,3 mm].

Condition the column by temperature programming of the oven at 3 °C/min from ambient temperature to a temperature 10 °C below the decompose limit of the stationary phase. Maintain the oven at this temperature for 1 h until stabilization of the baseline. Return it to 180 °C to work under isothermal conditions.

NOTE 6 Suitably pre-conditioned columns are available commercially.

4.1.5 Detector, preferably capable of being heated to a temperature above that of the column.

4.2 Syringe.

The syringe shall have a maximum capacity of 10 µl, and be graduated in 0,1 µl divisions.

4.3 Recorder.

If the recorder curve is to be used to calculate the composition of the mixture analysed, an electronic recorder of high precision, compatible with the apparatus used, is required. The recorder shall have the following characteristics:

- a) rate of response, below 1,5 s, preferably 1 s (the rate of response is the time taken for the re-

ording pen to pass from 0 % to 90 % following the sudden introduction of a 100 % signal);

- b) width of the paper, 20 cm minimum;
- c) paper speed, adjustable to values between 0,4 cm/min and 2,5 cm/min.

4.4 Integrator or calculator (optional).

Rapid and accurate calculation can be performed with the help of an electronic integrator or calculator. This shall give a linear response with adequate sensitivity, and the correction for deviation of the base-line shall be satisfactory.

5 Procedure

The operations described in 5.1 to 5.3 relate to the use of a flame-ionization detector.

As an alternative a gas chromatograph employing a catharometer detector (working on the principle of thermal conductivity changes) may be used. The operating conditions are then modified as described in clause 7.

5.1 Test conditions

5.1.1 Selection of optimum operating conditions

5.1.1.1 Packed column

In the selection of the test conditions, the following variables should be taken into account:

- a) the length and diameter of the column;
- b) the nature and amount of the stationary phase;
- c) the temperature of the column;
- d) the carrier gas flow;
- e) the resolution required;
- f) the size of the test portion, selected in such a way that the assembly of the detector and electrometer gives a linear response;
- g) the duration of analysis.

In general, the values given in table 1 and table 2 will lead to the desired results, i.e. at least 2000 theoretical plates per metre of column length for methyl stearate and its elution within about 15 min.

Where the apparatus allows it, the injector should be at a temperature of about 200 °C and the detector

at a temperature equal to or higher than that of the column.

As a rule, the ratio of the flow-rate of the hydrogen supplied to the flame-ionization detector to that of the carrier gas varies from 1:2 to 1:1 depending on the diameter of the column. The flow of oxygen is about 5 to 10 times that of the hydrogen.

Table 1

Internal diameter of column mm	Carrier gas flow ml/min
2	15 to 25
3	20 to 40
4	40 to 60

Table 2

Concentration of stationary phase % (m/m)	Column temperature °C
5	175
10	180
15	185
20	185

5.1.1.2 Capillary column

The properties of efficiency and permeability of capillary columns mean that the separation between constituents and the duration of the analysis are largely dependent on the flow-rate of the carrier gas in the column. It will therefore be necessary to optimize the operating conditions by acting on this parameter (or more simply on the headloss of the column), according to whether one wishes to improve the separations or to make a rapid analysis.

5.1.2 Determination of the number of theoretical plates (efficiency) and resolution

(See figure 1.)

Carry out the analysis of a mixture of methyl stearate and methyl oleate in about equivalent proportions (for example, methyl esters from cocoa butter).

Choose the temperature of the column and the carrier gas flow so that the maximum of the methyl stearate peak is recorded about 15 min after the solvent peak. Use a sufficient quantity of the mixture of methyl esters that the methyl stearate peak occupies about three-quarters of the full scale.

Calculate the number of theoretical plates, n (efficiency), using the formula

$$n = 16 \left(\frac{d_{r(I)}}{\omega_{(I)}} \right)^2$$

and the resolution, R , using the formula

$$R = \frac{2\Delta}{\omega_{(I)} + \omega_{(II)}}$$

where

$d_{r(I)}$ is the retention distance, in millimetres, from the start of the chromatogram to the maximum of the peak for methyl stearate;

$\omega_{(I)}$ and $\omega_{(II)}$ are the widths, in millimetres, of the peaks for methyl stearate and methyl oleate respectively, measured between the points of intersection of the tangents at the points of inflexion of the curve with the base-line;

Δ is the distance, in millimetres, between the peak maxima for methyl stearate and methyl oleate.

The operating conditions to be selected are those which will afford at least 2 000 theoretical plates per metre of column length for methyl stearate and a resolution of at least 1,25.

5.2 Test portion

Using the syringe (4.2), take 0,1 μ l to 2 μ l of the solution of methyl esters prepared according to ISO 5509 and inject them into the column.

In the case of esters not in solution, prepare a solution of approximately 100 mg/ml in heptane of chromatographic quality, and inject 0,1 μ l to 1 μ l of this solution.

If the analysis is for constituents present only in trace amounts, the size of the test portion may be increased (up to ten-fold).

5.3 Analysis

Generally, the operating conditions shall be those defined in 5.1.1.

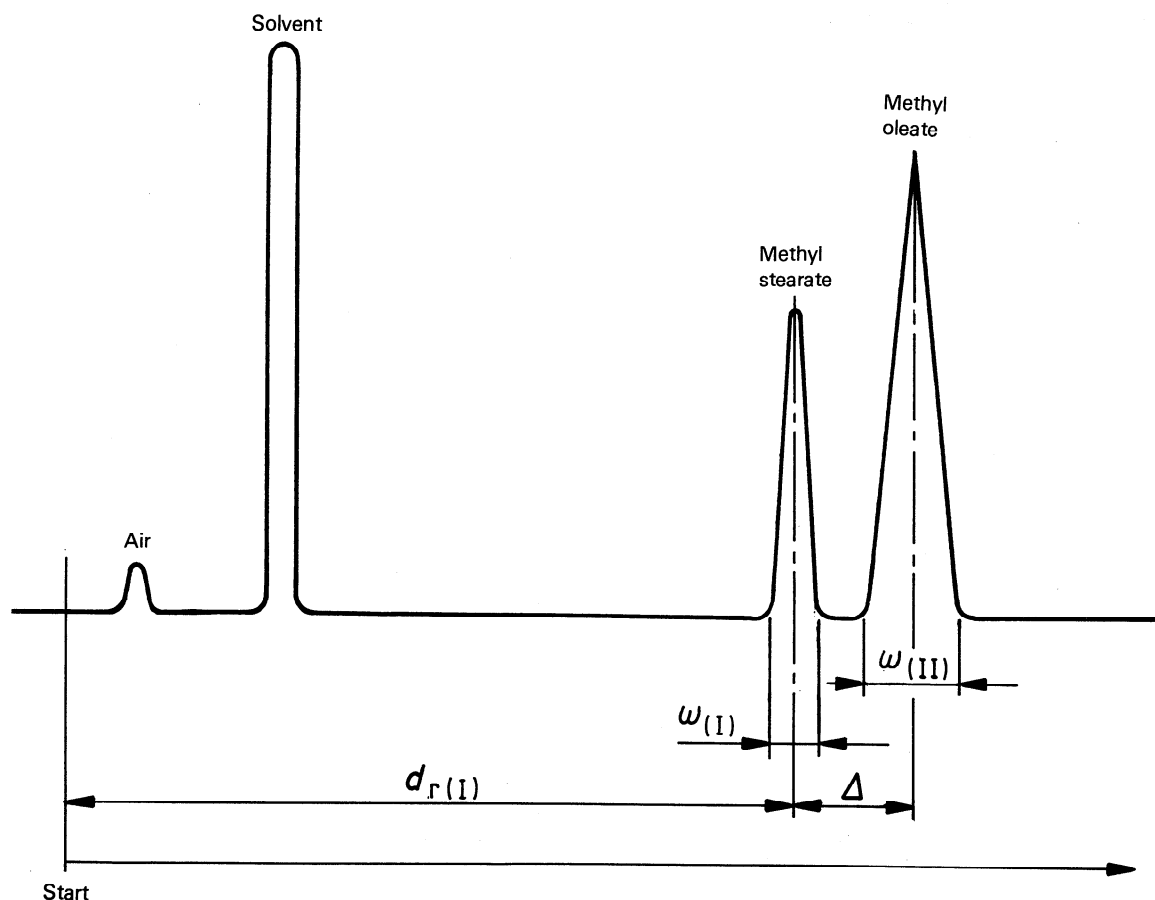


Figure 1 — Chromatogram for determining the number of theoretical plates (efficiency) and resolution

Nevertheless, it is possible to work with a lower column temperature when the determination of fatty acids with fewer than 12 carbon atoms is required, or at a higher temperature when determining fatty acids with more than 20 carbon atoms. On occasion, it is possible to employ temperature programming in both these cases. For example, if the sample contains the methyl esters of fatty acids with fewer than 12 carbon atoms, inject the sample at 100 °C (or at 50 °C to 60 °C if butyric acid is present) and immediately raise the temperature at a rate of 4 °C/min to 8 °C/min to the optimum. In certain cases, the two procedures can be combined.

After the programmed heating, continue the elution at a constant temperature until all the components have been eluted. If the instrument does not have programmed heating, use it at two fixed temperatures between 100 °C and 195 °C.

If necessary, it is recommended that an analysis be carried out on two fixed phases with different polarities to verify the absence of masked peaks, for example for fish oils or in the case of the simultaneous presence of C_{18:3} and C_{20:0}, or C_{18:3} and C_{18:2} conjugated.

5.4 Preparation of the reference chromatogram and reference graphs

Analyse the reference standard mixture (3.3), using the same operating conditions as those employed for the sample, and measure the retention times or retention distances for the constituent fatty acids. Construct on semi-logarithmic paper, for any degree of unsaturation, the graphs showing the logarithm of retention time or distance as a function of the number of carbon atoms. In isothermal conditions, the graphs for straight-chain acids of the same degree of unsaturation should be straight lines. These lines should be approximately parallel.

It is necessary to avoid conditions such that "masked peaks" exist, i.e. where the resolution is insufficient to separate two constituents.

6 Expression of results

6.1 Qualitative analysis

Identify the methyl ester peaks for the sample from the graphs prepared in 5.4, if necessary by interpolation.

6.2 Quantitative analysis

6.2.1 Determination of the composition

Apart from exceptional cases, use the internal normalization method, i.e. assume that the whole of the components of the sample are represented on the

chromatogram, so that the total of the areas under the peaks represents 100 % of the constituents (total elution).

If the equipment includes an integrator, use the figures obtained therefrom. If not, determine the area under each peak by multiplying the height of the peak by its width at mid-height, and where necessary take into account the various attenuations used during the recording.

6.2.2 Method of calculation

6.2.2.1 General case

Calculate the content of a given component *i*, expressed as a percentage by mass of methyl esters, by determining the percentage represented by the area of the corresponding peak relative to the sum of the areas of all the peaks, using the following formula:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

where

A_i is the area under the peak corresponding to component *i*;

$\sum A$ is the sum of the areas under all the peaks.

Give the result to one decimal place.

NOTE 7 In this general case, the result of the calculation based on relative areas is considered to represent a percentage by mass. For the cases in which this assumption is not allowed, see 6.2.2.2.

6.2.2.2 Use of correction factors

In certain cases, for example in the presence of fatty acids with fewer than 8 carbon atoms or of acids with secondary groups, when using thermal conductivity detectors or where the highest degree of accuracy is particularly required, correction factors should be used to convert the percentages of peak areas into mass percentages of the components.

Determine the correction factors with the help of a chromatogram derived from the analysis of a reference mixture of methyl esters of known composition, carried out under operating conditions identical with those used for the sample.

For this reference mixture, the percentage by mass of component *i* is given by the formula

$$\frac{m_i}{\sum m} \times 100$$

where

- m_i is the mass of component i in the reference mixture;
- $\sum m$ is the total of the masses of the various components of the reference mixture.

From the chromatogram of the reference mixture (5.4), calculate the percentage (area/area) for component i as follows:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

where

- A_i is the area under the peak corresponding to component i ;
- $\sum A$ is the sum of the areas under all the peaks.

The correction factor is then calculated as

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Commonly, the correction factors are expressed relative to K_{C16} , so that the relative factors become

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

For the sample, the content of each component i , expressed as a percentage by mass of methyl esters, is

$$\frac{K'_i \times A_i}{\sum (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Give the results to one decimal place.

6.2.2.3 Use of an internal standard

In certain analyses (for example where not all of the fatty acids are quantified, such as when acids with 4 and 6 carbons are present alongside acids with 16 and 18 carbons, or when it is necessary to determine the absolute amount of a fatty acid in a sample) it is necessary to use an internal standard. Fatty acids with 5, 15 or 17 carbons are frequently used. The correction factor (if any) for the internal standard should be determined.

The percentage by mass of component i , expressed as methyl esters, is then given by the formula

$$\frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

where

- A_i is the area under the peak corresponding to component i ;
- A_s is the area under the peak corresponding to the internal standard;
- K'_i is the correction factor for component i (relative to K_{C16});
- K'_s is the correction factor for the internal standard (relative to K_{C16});
- m is the mass, in milligrams, of the test portion;
- m_s is the mass, in milligrams, of the internal standard.

Give the results to one decimal place.

6.2.3 Precision

The values for repeatability and reproducibility given below cover the preparation of the methyl esters according to ISO 5509, together with the gas chromatographic analysis described in this International Standard. The figures have been accepted historically.

6.2.3.1 Repeatability

The difference between the values of two determinations, carried out in rapid succession by the same operator using the same apparatus on the same test sample and for constituents present in excess of 5 % (m/m), shall not exceed 3 % (relative) of the determined value, with a maximum of 1 % (m/m). For constituents present in smaller quantities, the difference shall not exceed a value of 0,2 % (m/m).

6.2.3.2 Reproducibility

The difference between the values of the final result obtained by two different laboratories, using this method for the analysis of the same laboratory sample for constituents present in excess of 5 % (m/m), shall not exceed 10 % (relative) of the determined value, with a maximum of 3 % (m/m). For constituents present in smaller quantities, this difference shall not exceed a value of 0,5 % (m/m).

7 Special case — Use of a catharometer detector (working on the principle of thermal conductivity changes)

A gas chromatograph employing a detector working on the principle of thermal conductivity changes (a catharometer) may also be used for the determination of the qualitative and quantitative composition of a mixture of fatty acid methyl esters. If it is

used, the conditions specified in clause 4 and clause 5 should be modified as shown in table 3.

For quantitative analysis, use the correction factors defined in 6.2.2.2.

Table 3

Variable	Value/condition
Column	Length: 2 m to 4 m Internal diameter: 4 mm
Support	Grain size between 160 μm and 200 μm
Concentration of stationary phase	15 % (m/m) to 25 % (m/m)
Carrier gas	Helium or, failing this, hydrogen, with as low an oxygen content as possible
Auxiliary gases	None
Injector temperature	From 40 °C to 60 °C above that of the column
Column temperature	180 °C to 200 °C
Flow of carrier gas	Usually between 60 ml/min and 80 ml/min
Size of test portion injected	Usually between 0,5 μl and 2 μl

8 Test report

The test report shall specify the methods used for the preparation of the methyl esters and for the gas chromatographic analysis, and the results obtained. It shall also mention all operating details not specified in this International Standard, or regarded as optional, together with details of any incidents which may have influenced the results.

The test report shall include all information necessary for the complete identification of the sample.

This page intentionally left blank

This page intentionally left blank

UDC [664.3 + 665.2/.3]:665.12:543.544.25:661.73

Descriptors: agricultural products, fats, animal fats, vegetable fats, oils, animal oils, vegetable oils, fatty acids, methyl ester, gas phase chromatography.

Price based on 7 pages

ANEXO 3

MENU MODELO DIETA

Tiempo de comida	Preparación	Ingredientes	Medida casera	g ó cc
DESAYUNO	Jugo de naranja		1 vaso	200
	Huevo revuelto	Huevo Cebolla Tomate	1 unidad	45 5 10
	Queso descremado		1 tajada delgada	90
	Café con leche	Leche entera Café infusión Azúcar	½ pocillo ½ pocillo 1 cucharadita	120 120 5
	Pan blanco			45
ALMUERZO	Sopa de cebada	Cebada Pasta Papa Cebolla Alverja Agua	1 plato sopero	20 10 10 5 15 150
	Carne en tomatada	Carne Pasta de tomate	1 porción	100 30
	Arroz blanco			120
	Papa con pellejo			70
	Habichuela		½ pocillo	60
	Jugo de guayaba		Guayaba Agua Azúcar	110 120 10
ONCES	Tinto		1 pocillo tintero	120
	Galletas dulces			25
COMIDA	Pollo asado		Pierna - permil	110
	Plátano maduro con arequipe		Plátano Arequipe	45 10
	Ensalada fresca	Lechuga Tomate Pepino Vinagreta	1 porción	20 30 10 5
	Gaseosa regular		1 vaso	220 cc

ANALISIS NUTRICIONAL

Energía: 2000 Kcals (VCT)

Colesterol: Dieta con tres huevos por semana: 250 mg

Dieta con un huevo diario: 441 mg

NUTRIENTE	g	% del VCT
Proteína	69	13.8
Grasa	76	34.2
Carbohidratos	265	51.9



ANEXO 4

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN/DOCENCIA EN LO REFERENTE A MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO

Investigador principal: _____

Título del proyecto o protocolo: _____

Equipo de docencia o investigación (Personas que manipularán los animales de éste proyecto).

Nombre	Departamento	Investigador	Estudiante		Residente
			Pregrado	Posgrado	

Organismo financiador

Pontificia Universidad Javeriana COLCIENCIAS Otro _____

Naturaleza del trabajo

<input type="checkbox"/> Investigación	<input type="checkbox"/> Proyecto nuevo	<input type="checkbox"/> Proyecto en curso	<input type="checkbox"/> Prueba piloto
<input type="checkbox"/> Tesis	<input type="checkbox"/> Especialidad	<input type="checkbox"/> Maestría	<input type="checkbox"/> Doctorado
<input type="checkbox"/> Docencia	<input type="checkbox"/> Pregrado	<input type="checkbox"/> Posgrado	

Supervisado por (Nombre y cargo): _____

Los estudiantes: Manipularán los animales No manipularán los animales

Duración estimada del tiempo de trabajo con animales de laboratorio: _____

Animales requeridos

Especie	Cepa	Edad	Sexo	Peso	Cantidad	Procedencia

Procedimiento de tipo: Terminal o agudo Crónico

Categoría de la invasividad (ver categorización correspondiente en la cartilla).

A B C D E

Síntesis de los objetivos de la práctica:

La siguiente información será de utilidad para facilitar el desarrollo de las tareas que usted ha propuesto realizar, por ello le solicitamos diligenciarlas en su totalidad y dar a continuación los detalles pertinentes:

Para realizar las pruebas requiere:

Animales SI NO
 Jaulas SI NO
 Comida SI NO
 Aserrín SI NO

El proyecto va sufragar los costos de:

Animales SI NO
 Jaulas SI NO
 Comida SI NO
 Aserrín SI NO

En caso de que no se financien los costos por parte del proyecto, como se cubrirán estos costos?

Para realizar las pruebas requiere inmovilizar a su animal? SI NO

Si su respuesta es afirmativa, que tipo de inmovilización hará? Qué método y duración tendrá? _____

Realizara procedimientos invasivos? SI NO
Si su respuesta es afirmativa, de que tipo, frecuencia y duración serán estos procedimientos? Cuáles son los efectos clínicos esperados durante ellos? Igual si su respuesta es negativa. _____

El animal será sometido a algunos tipos de privaciones? SI NO
Si esto es previsible, de qué tipo, duración y frecuencia? Qué se espera como efecto clínico? _____

Le serán administrados al animal algún tipo de agentes químicos o biológicos?
SI NO
En caso de que su respuesta sea afirmativa, que tipo de agentes usará, que dosis suministrará. Que vías y frecuencia empleará y que efectos clínicos espera?

Para la realización del experimento o práctica recurrirá al empleo de agentes anestésicos?
SI NO
En caso afirmativo, de qué tipo son? Que producto utilizará? (nombre genérico o comercial). Con que frecuencia los aplicará? _____

Describa a continuación el tipo de manejo que requerirá su animal o grupo de animales en cuanto a dietas, antibióticos, cuidados especiales, etc. _____

Enumere el nombre o nombres de él o las personas que se encargarán de éstos cuidados especiales en los animales durante el desarrollo del proyecto o práctica. _____

En caso de presentarse dolor durante los procedimientos, que medidas se utilizarán para aliviarlo? _____

Que método de eutanasia se llevará a cabo al final del procedimiento? Quién lo realizara?

Riesgos para el personal o para la población animal del Bioterio

Sin riesgo Riesgo potencial

Químicos

Biológicos

Radioactivos

Cancerígenos

Medidas propuestas por el investigador para disminuir el riesgo.

Identificación de las personas que se pueden contactar en caso de emergencia.

Suministre los datos de una persona a quien se pueda recurrir en caso de algún imprevisto durante el experimento o práctica y de un nombre alternativo con el mismo fin.

PARA USO DEL COMITÉ DE ETICA

APROBADO PARA SU REALIZACIÓN REMITIR PARA SU CORRECIÓN

Comentarios:

Firma y Sello Responsable

Seguridad en el bioterio.

Se exige que el estudiante lea las normas de seguridad cuidadosamente y los principios básicos para el manejo de animales de laboratorio, para que luego firme el acuerdo y lo entregue al instructor del laboratorio. Cuando usted este en el bioterio, PIENSE todo el tiempo en lo que usted este haciendo.

Normas de seguridad

- No se debe hacer bajo ninguna circunstancia experimento alguno que no haya sido autorizado.
- Es de uso obligatorio una bata y se recomienda que sea de uso exclusivo para el bioterio.
- Se recomienda usar gafas de seguridad cuando el procedimiento lo requiera.
- Debe conocer la localización del equipo de seguridad y primeros auxilios.
- Utilice guantes quirúrgicos para el manejo de los animales.
- Mientras este en el bioterio no se lleve nada a la boca.
- Mantenga el área de trabajo limpia.
- Use solamente equipo que este en buenas condiciones.
- Descarte en forma apropiada todo tipo de desperdicios. Use bolsas rojas para material biológico.
- Rotule todas las jaulas.
- Informe inmediatamente al coordinador cualquier accidente, no importa cuan pequeño haya sido.
- No se debe consumir alimento ni bebidas, ni fumar en el bioterio.
- Si tiene problemas respiratorios (asma), neurológicos o alergias infórmelo por escrito al coordinador.
- Solamente se admite el acceso a personas autorizadas (no se aceptan visitas).
- Evite causa molestias a los animales que no están bajo su responsabilidad.

He leído cuidadosamente todas las normas de seguridad anteriormente resumidas y *los principios básicos para el manejo de animales de laboratorio* reconozco que es mi entera responsabilidad cumplirlas durante mis prácticas en el bioterio.

Fecha _____

NOMBRE _____

FIRMA _____

ANEXO 5

PROYECTO:

DIETA # _____
CONEJO # _____

FORMATO DE RECOLECCION DE PESO DE CONEJOS Y COMIDA CONSUMIDA

Semana 1 de tratamiento

Peso inicial: _____

Lunes		Martes		Miércoles		Jueves	
Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante

Viernes		Sábado		Domingo	
Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante

Semana 2 de tratamiento

Peso: _____

Lunes		Martes		Miércoles		Jueves	
Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante

Viernes		Sábado		Domingo	
Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante	Ofrecida	Sobrante

ANEXO 6

Bogotá,

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ con c.c. # _____ certifico que he sido ampliamente informada sobre el objeto del proyecto “Efecto del consumo de tocotrienoles y tocoferoles de la dieta sobre el perfil lipídico y la proteína C Reactiva en mujeres jóvenes” y he decidido participar voluntariamente en él. Entiendo que al inicio de la dieta y al finalizarla me tomarán una muestra de sangre para la determinación de colesterol total, colesterol bueno (HDL), colesterol malo (LDL), triglicéridos y proteína C Reactiva. Entiendo que el tratamiento consiste en cocinar mis comidas normales con el aceite suministrado. Entiendo que la dieta durará 30 días, tiempo durante el cual me he comprometido voluntariamente a evitar el consumo de cereales integrales y de frituras diferentes a las que sean preparadas con el aceite suministrado. Entiendo que con esta dieta y la toma de muestra de sangre no se pone en peligro mi salud. Entiendo que me podré retirar del estudio en el momento que lo desee.

Así mismo, soy conciente que los datos obtenidos de mis diarios de consumo podrán ser utilizados posteriormente en procesamientos estadísticos en los que se divulgarán valores grupales resultados de los análisis, pero no serán divulgados los puntajes individuales derivados de mi diario.

Nombre:
c.c. #

Testigo:

Nombre:
c.c. #

ANEXO 7

CODIGO			
--------	--	--	--

ENCUESTA DE SALUD, NUTRICION Y ALIMENTACIÓN

PROYECTO: Efecto de los tocotrienoles de la dieta sobre el perfil lipídico y la capacidad oxidativa en mujeres jóvenes

OBJETIVOS:

- ◆ Describir el perfil antropométrico, de consumo de energía y nutrientes, los antecedentes de salud y las características de estilo de vida de los sujetos participantes en la investigación
- ◆ Diagnosticar el estado nutricional de los sujetos participantes en la investigación mediante indicadores antropométricos y de consumo de alimentos.

La presente encuesta consta de dos partes, la primera sobre salud y estilos de vida y la segunda sobre frecuencia de consumo.

PRIMERA PARTE: SALUD Y ESTILOS DE VIDA

Este cuestionario consta de 22 preguntas acerca de aspectos relacionados con la salud y estilo de vida. Los datos que se suministren serán de carácter estrictamente confidencial.

Fecha: Día ____ Mes ____ Año ____

Documento de Identidad _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

E-mail _____

DATOS GENERALES

1. Lugar de nacimiento: Departamento _____ Ciudad _____

2. Fecha de nacimiento Día ____ Mes ____ Año ____

Coloque un X en el cuadro que corresponda a la respuesta

3. Cual es su estado civil actual?

Soltero 1

Casado/unión libre 2

Viudo 3

Separado 4

ANTECEDENTES MEDICOS

4. Usted considera que en general su salud es:
- Excelente..... 1
 - Buena..... 2
 - Regular..... 3
 - Mala..... 4
5. Usted considera que su peso corporal es:
- Elevado..... 1
 - Normal..... 2
 - Bajo..... 3

Coloque una X en el cuadro que corresponda a la respuesta

6. Alguna vez un médico le ha diagnosticado:
- | | SI | NO |
|---|----------------------------|----------------------------|
| a) Hipertensión arterial..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| b) Infarto cardiaco..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| c) Aumento de colesterol o triglicéridos..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| d) Diabetes..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| e) Cáncer..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| f) Exceso de peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| g) Bajo peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| h) Hipotiroidismo o hipertiroidismo..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |

Si su respuesta en todos los casos es negativa pase a la pregunta 11

7. Le han formulado medicamento para el tratamiento de:
- | | SI | NO |
|---|----------------------------|----------------------------|
| a) Hipertensión arterial..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| b) Infarto cardiaco..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| c) Aumento de colesterol o triglicéridos..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| d) Diabetes..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| e) Cáncer..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| f) Exceso de peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| g) Bajo peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| h) Hipotiroidismo o hipertiroidismo..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |

8. Ha seguido una dieta para el tratamiento de
- | | SI | NO |
|---|----------------------------|----------------------------|
| a) Hipertensión arterial..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| b) Aumento de colesterol o triglicéridos..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| c) Diabetes..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| d) Exceso de peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| e) Bajo peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |
| f) Hipotiroidismo o hipertiroidismo..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 |

9. A sus padres o abuelos les han diagnosticado:
- | | SI | NO | NO SABE |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| a) Hipertensión arterial..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |
| b) Infarto cardiaco..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |
| c) Aumento de colesterol o triglicéridos..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |
| d) Diabetes..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |
| e) Cáncer..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |
| f) Exceso de peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |
| g) Bajo peso..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |
| h) Hipotiroidismo o hipertiroidismo..... | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 8 |

Coloque una X en el cuadro que corresponda a la respuesta

10. Utiliza usted actualmente anticonceptivos orales?
- | | |
|---------|----------------------------|
| Si..... | <input type="checkbox"/> 1 |
| No..... | <input type="checkbox"/> 2 |

ESTILO DE VIDA

11. Cuantas horas en promedio duerme en la noche?
- | | |
|----------------------|----------------------------|
| 6 horas o menos..... | <input type="checkbox"/> 1 |
| 7 horas..... | <input type="checkbox"/> 2 |
| 8 horas o más..... | <input type="checkbox"/> 3 |

12. Se considera un fumador habitual?
- | | | |
|---------|----------------------------|--------------------------------|
| Si..... | <input type="checkbox"/> 1 | (pase a la siguiente pregunta) |
| No..... | <input type="checkbox"/> 2 | (pase a la pregunta 16) |

13. Qué edad tenía cuando comenzó a fumar? _____ años

14. En relación con el hábito de fumar, usted:
- Dejo de fumar hace más de 10 años..... 1 (pase a la pregunta 16)
 - Dejó de fumar hace menos de 10 años..... 2 (pase a la pregunta 16)
 - Fuma en algunas ocasiones..... 3 (pase a la pregunta 16)
 - Fuma todos los días..... 4

15. En promedio cuantos cigarrillos fuma por día? _____ cigarrillos

16. Su consumo de bebidas alcohólicas es:
- 1 vez al día..... 1
 - 3 veces por semana..... 2
 - 1 vez por semana..... 3
 - Ocasionalmente..... 4
 - Nunca..... 5 (pase a la pregunta 18)

17. La bebida alcohólica que acostumbra consumir es:
- Vino..... 1
 - Whisky, brandy o ginebra..... 2
 - Ron..... 3
 - Aguardiente..... 4
 - Cerveza..... 5
 - Otras..... 6
 - Cual _____

Coloque una X en el cuadro que corresponda a la respuesta

18. Desarrolla actividad física que le produzca sudor y/o cansancio:
- 1 vez al día..... 1
 - 3 veces por semana..... 2
 - 1 vez por semana..... 3
 - Ocasionalmente..... 4
 - Nunca..... 5 (pase a la pregunta 20)

19. El tiempo que dedica al desarrollo de actividad física es de:
- Menos de 30 minutos..... 1
 - Entre 30 y 60 minutos..... 2
 - Más de 60 minutos..... 3

20. En el momento de comer, usted adiciona sal a sus alimentos:

- Siempre..... 1
- Después de probarlos..... 2
- Nunca..... 3

21. A sus bebidas frías (jugos) o calientes (café), para endulzar les adiciona:

- Azúcar, panela, miel..... 1
- Endulzantes artificiales..... 2
- Nada..... 3

22. Para la preparación de sus alimentos, emplea:

- Aceite vegetal..... 1
- Margarina..... 2
- Mantequilla..... 3

SEGUNDA PARTE: FRECUENCIA DE CONSUMO

Esta parte del cuestionario consta de 2 páginas que deben ser llenadas de forma clara teniendo en cuenta todos los alimentos que consume el individuo y la cantidad que consume de cada uno de ellos. A continuación se da un ejemplo de la forma de llenar este segundo componente de la encuesta que esta dividida en dos partes:

1. **CON QUÉ FRECUENCIA** en promedio, consumió el individuo el alimento en el último año? No omitir ningún alimento. Marcar “Nunca” si no lo consume.

Las otras alternativas son:

- poco al año
- 1 vez al mes
- 2 a 3 veces al mes
- 1 vez por semana
- 2 veces por semana
- 3 a 4 veces por semana
- 5 a 6 veces por semana
- Diariamente

2. **QUE CANTIDAD** del alimento usualmente consumió?

Algunas veces se pregunta cuantas unidades consumió, por ejemplo 1 huevo o 2 huevos, en los días que lo consumió.

Otras veces se pregunta qué cantidad en pocillos o vasos.



Para cada alimento coloque una X en la casilla correspondiente a la frecuencia con que lo consumió y otra X en la casilla de la cantidad.

Ejemplo: una persona consume jugo de naranja dos veces por semana, 1 vaso en cada ocasión y tres veces por mes come medio pocillo de cereal.

Con que frecuencia	Nunca	poco /año	1 vez /mes	2-3 v /mes	1 v /sem	2 v /sem	2-4 v /sem	5-6 v/sem	Diario	Que cantidad cada vez			
										1/2	1	2	
Toma bebidas como:													
Jugo de naranja						X				Vaso		X	
Consumo:													
Cereal para el desayuno				X						Pocillo	X		

CODIGO														
Nombre														
CON QUE FRECUENCIA	Nunca	poco	1 vez	2-3 v	1 vez	2 v	3-4 v	5-6 v	diario	Qué cantidad cada vez?	1/2	1	2	3
	/año	/mes	/mes	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.						
Toma bebidas como:										v				
Jugo de naranja										a				
Otros jugos										s				
Leche										o				
Qué clase de leche?										s				
marque solo una	entera ()	semidescremada ()	descremada ()							de soya ()				
Bebidas gaseosas										v				
Cerveza										a				
Vino										s				
Licores										o				
Agua										s				
Agua de panela										poci-				
Chocolate										llos				
Café										poci-				
Qué le adiciona al café?	leche ()	crema ()	crema no láctea()	nada ()						llos	1	2	3	4
	azúcar ()	miel ()	panels ()	edulcorante ()						cdita.				
Consumo frutas como:	Nunca	poco	1 vez	2-3 v	1 vez	2 v	3-4 v	5-6 v	diario	Qué cantidad cada vez?	1/2	1	2	3
	/año	/mes	/mes	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.						
Duraznos o mangos														
Bananos														
Manzanas o peras														
Naranjas o mandarinas										poci-	1/4	1/2	1	2
Uvas, fresas										llos				
Papaya, melón o patilla										poci-				
Enlatada o uvas pasas										llos				
Consumo:	Nunca	poco	1 vez	2-3 v	1 vez	2 v	3-4 v	5-6 v	diario	Qué cantidad cada vez?	1/2	1	2	3
	/año	/mes	/mes	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.						
Pan														
el pan que consume es:	blanco ()	integral ()												
adiciona al pan	mantequilla ()	queso de untar ()	margarina()	mememalada()	nada ()									
Arepa														
Huevo														
el huevo lo consume:	cocido/tibio ()	revuelto/perico ()	frito ()											
Queso										tajadas				
el queso que come es:	grasoso ()	bajo en grasa ()	no sabe ()								1/2	1	2	3
Yogur o kumis										poci-				
Yogur o kumis dietéticos										llos				
Avena										poci-				
Cereal para el desayuno										llos				
Cereal alto en fibra														
Consumo:	Nunca	poco	1 vez	2-3 v	1 vez	2 v	3-4 v	5-6 v	diario	Qué cantidad cada vez?	1/4	1/2	1	2
	/año	/mes	/mes	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.						
Aguacate														
Arveja verde										po-				
Espinaca, ensalada verde										ci-				
Maíz										llos				
Tomate (rodajas)														
Zanahoria sola o mezclada										poci-				
Sopa de verduras										llos				
Salsa de tomate										cda.	1	2	3	4
la salsa es	grasosa ()	baja en grasa ()	no sabe ()											
Consumo:	Nunca	poco	1 vez	2-3 v	1 vez	2 v	3-4 v	5-6 v	diario	Qué cantidad cada vez?	1/2	1	2	3
	/año	/mes	/mes	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.	/sem.						
Papa cocida, asada														
Yuca, arracacha (astilla)														
Plátano hartón														
Papas a la francesa, fritas										poci-				
Arroz										llos				
Espaguetis, pasta										poci-				
Sopa de harinas										llos				
Fríjol, lenteja o arveja seca														

ANEXO 8

DIARIO DE CONSUMO

NOMBRE: _____ FECHA: _____

A continuación se presenta un ejemplo de cómo debe reportar su alimentación diaria. Por favor recuerde que debe escribir todo alimento (líquido ó sólido) que consuma durante el día, especificando los ingredientes y cantidad de cada preparación

Ejemplo:

Hora	Comida	Preparación	Ingredientes	Cantidad
7: 30 am	Desayuno	Huevos revueltos	Huevos Tomate Cebolla Aceite	2 unidades medianas 1 cucharadita 1 cucharadita 2 cucharaditas
		Pan con mermelada	Pan blanco de molde Mermelada de mora	2 unidades 1 cucharada colmada
		Café con leche sin azúcar	Leche entera Nescafé	1 pocillo chocolatero 2 cucharaditas
		Jugo de naranja	Jugo natural de naranjas	1 vaso de 8 oz.

DIARIO DE CONSUMO

NOMBRE: _____

FECHA: _____

Hora	Comida	Preparación	Ingredientes	Cantidad

ANEXO 9

MODELOS DE ALIMENTOS DE PORCIONES PROMEDIO



FRUTAS



CARNES Y LEGUMINOSAS



VERDURAS



HARINAS



COMIDAS RAPIDAS

ANEXO 10

FORMATO DE CONVERSION MEDIDAS CASERAS A UNIDADES SISTEMA METRICO

A continuación se presenta un modelo de cómo se realizó la conversión de cada preparación reportada en los diarios de consumo.

COMIDA	PREPARACION	ALIMENTOS - DESCRIPCION	CANTIDAD COMUN	CANTIDAD g/cc
Desayuno	Leche con azúcar	Leche entera Azúcar	1 vaso 2 cdtas	240 c.c. 10 g
	Pan tajado - Comapan	Tajada pan	2 unidades	30 g (15 g c/u)
	Papaya picada	Papaya	1 pocillo	133 g
etc....	Huevo tibio	Huevo	1 unidad	62 g

ANEXO 11

APLICATIVO EXCEL DESARROLLADO PARA ANALISIS DE DIETAS

TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS										
Grupo de Alimentos		Alimento base	Energía	Proteína	Grasa T	Grasa S	Grasa M	Grasa P	Colesterol	CHO
1	1001	kumis entero	76	3.5	0.4	0	0	0	0	14.9
	1002	kumis descremado	63	5.3	1.66	1	0.43	0.04	0.04	7
	1003	leche entera pasteurizada	61	3.3	3.3	2.08	0.97	0.12	14	4.7
	1004	leche pasteurizada semidescremada	50	3.3	1.9	1.20	0.56	0.07	8	4.8
	1005	leche pasteurizada descremada	35	3.4	0.2	0.12	0.05	0.01	2	4.9
	1006	leche en polvo entera	496	26.3	26.7	16.74	7.92	7.92	97	38.4
	1006	leche en polvo descremada instantanea	358	35.1	0.7	0.47	0.19	0.03	18	52.2
	1007	queso cuajada	256	15.6	18.9	0	0	0	0	6.1
	1008	queso descremado blando	128	26	1	0	0	0	0	2
	1009	queso entero duro	387	25	31.1	19.20	8.69	1.65	116	2
	1010	queso entero semiblando	280	21.7	19	0	0	0	0	5.1
	1011	queso parmesano	456	41.6	30.0	19.07	8.73	0.66	79	3.7
	1012	queso americano para untar pasteurizado	290	16.4	21.2	13.33	6.22	0.62	55	8.7
	1013	yogurt entero	94	2.9	2.9	0	0	0	0	14.6
	1014	yogurt con fruta bajo en grasa	105	4.9	1.4	0.91	0.39	0.04	6	18.6
	1015	avena alqueria	172	4	4	2	0	0	1	30
	1016	alpinito	300	0.15	3.7	0	0	0	0	0

COD	Alimento base	DIGITAR CONSUMO/DÍA						
		1	2	3	4	5	6	7
1001	kumis entero							
1002	kumis descremado							
1003	leche entera pasteurizada	440	220	220	220	440	440	220
1004	leche pasteurizada semidescremada							
1005	leche pasteurizada descremada							
1006	leche en polvo entera							
1006	leche en polvo descremada instantánea							
1007	queso cuajada							
1008	queso descremado blando							
1009	queso entero duro							
1010	queso entero semiblando							
1011	queso parmesano							
1012	queso americano para untar pasteurizado							
1013	yogurt entero							
1014	yogurt con fruta bajo en grasa							
1015	avena alqueria							
1016	alpinito						97	

individuo	S02	semana	4							
		días	1	2	3	4	5	6	7	
		tipo de días	F	F	N	N	N	N	N	
			DIAS							
Nutriente	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL		
Energía	1344.35	1586	1387.9	1526.75	1837.3	1533.83	1270.45	10486.58		
Proteínas	55.675	74.83	60.012	65.422	67.97	62.0955	57.77	443.7745		
Grasa Total	42.485	47.83	46.557	47.107	62.61	49.531	53.29	349.41		
Grasa Saturada	20.375	20.896	19.0537	19.1467	27.801	21.5388	23.987	152.7982		
Grasa Monoinsat	15.085	17.698	17.7218	17.6678	24.088	15.8726	18.648	126.7812		
Grasa Poliinsat	3.436	4.174	5.6501	5.6901	5.231	5.3088	6.2955	35.7855		
Colesterol	127.9	162	154.85	154.85	154.1	145.4	137	1036.1		
CHO	210.17	261.22	198.425	232.11	250.43	144.601	179.43	1476.386		
Fibra	7.72	7.3	6.76	11.56	13.36	5.9	7.545	60.145		
Calcio	748.55	462.2	451.02	470.27	900.6	824.25	351.75	4208.64		
Fósforo	916.65	1010.2	743.19	869.09	1016.5	989.375	848.35	6393.355		
Hierro	8.545	12.67	9.048	10.783	12.6	9.8786	7.135	70.6596		
Sodio	1041.05	1013.9	982.5	992.3	1804.9	1162.25	390.05	7386.95		
Potasio	1914.4	2157.2	1190.83	2139.23	2259	1378.18	2251.45	13290.29		
Magnesio	166.1	173	129.4	168.2	206.5	148.8	162.55	1154.55		
Zinc	8.0255	12.025	8.1462	8.5347	9.295	4.9425	10.465	61.4339		
Cobre	0.734	0.62	0.4685	0.8775	0.893	0.39	0.7655	4.7485		
Vit. A	410.4	697	109.37	308.57	256.6	626.58	585	2993.52		
Tiamina	1.1805	1.096	0.9222	1.3172	1.876	0.989	0.6005	7.9814		
Riboflavina	1.615	1.796	1.2244	1.3674	2.123	1.8755	1.009	11.0103		
Niacina	14.932	27.27	17.386	24.786	20.23	19.904	14.77	139.278		
B6	1.309	1.434	1.0215	1.7655	1.277	0.868	1.821	9.496		
Folato	193.3	189.4	179.12	182.52	347.4	346.642	79.65	1518.032		
B12	5.201	7.984	4.6477	4.6477	5.334	2.693	6.642	37.1494		
Vit. C	49.9	178.3	14.8	114.5	91.5	43.84	41.15	533.99		
Vit. E	5.1289	5.8374	4.73055	4.27455	5.5869	5.8795	7.056	38.4938		

ANEXO 12

ENSAYO 1: MODELACIÓN DEL EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Parte 1: Situación del perfil lipídico al inicio del estudio

Para el caso del COLESTEROL el programa utilizado fue:

```
model {
  for (i in 1:20) {
    colest[i] ~ dnorm( a[ tto[i] ] , tau)
  }

  for (i in 1:4) { a[i] ~ dnorm(0.0,1.0E-04) }
  tau ~ dchisqr(1)
  s <- sqrt(1/tau)
}
```

El programa utilizado para el análisis del HDL y el LDL fue semejante.

Parte 2: Modelación del efecto de los diferentes tipos de grasa.

El programa utilizado en el caso del COLESTROL fue:

```
model{
  for (i in 1:4)
  {
    for (j in 1:5)
    {
      for (k in 1:5)
      {
        T2[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],2)
        T3[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],3)
        T4[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],4)

        M2[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],2)
        M3[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],3)
        M4[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],4)
        M5[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],5)
      }}
    for (i in 1:4) {
      for (j in 1:5) {
        for (k in 1:5)
        {
          colest[i,j,k] ~ dnorm( mu[i,j,k], tau)
        }
      }
    }
  }
}
```

```

mu[i,j,k] <- m + a2 * T2[i,j,k] + a3 * T3[i,j,k] + a4 * T4[i,j,k] + b2 * M2[i,j,k] + b3 *
M3[i,j,k] + b4 * M4[i,j,k] + b5 * M5[i,j,k] + s[i,j]
}}
pa2<-step(a2)
pa3<-step(a3)
pa4<-step(a4)
pb2<-step(b2)
pb3<-step(b3)
pb4<-step(b4)
pb5<-step(b5)
for (i in 1:4) {
for (j in 1:5)
{ s[i,j] ~ dnorm(0,tau2)}}
tau~dgamma(0.01,0.01)
tau2~dgamma(0.01,0.01)
s1 <- sqrt(1/tau)
s2 <- sqrt(1/tau2)
m ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
a2 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
a3 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
a4 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
b2 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
b3 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
b4 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
b5 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
}

```

El programa utilizado para el análisis del HDL y el LDL fue semejante.

ANEXO 13

ENSAYO 2: MODELACIÓN DEL EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Para el caso del COLESTEROL el programa utilizado fue:

```
model{
for (i in 1:8)
{
for (j in 1:10)
{
for (k in 1:5)
{
T02[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],2)
T03[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],3)
T04[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],4)
T05[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],5)
T06[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],6)
T07[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],7)
T08[i,j,k] <- equals(tto[i,j,k],8)
M02[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],2)
M03[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],3)
M04[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],4)
M05[i,j,k] <-equals(mom[i,j,k],5)
}}}
for (i in 1:8) {
for (j in 1:10) {
for (k in 1:5)
{
colest[i,j,k] ~ dnorm( mu[i,j,k], tau)
mu[i,j,k] <- m + a2 * T02[i,j,k] + a3 * T03[i,j,k] + a4 * T04[i,j,k] + a5 * T05[i,j,k] + a6 *
T06[i,j,k] + a7 * T07[i,j,k] + a8 * T08[i,j,k] + b2 * M02[i,j,k] + b3 * M03[i,j,k] + b4 *
M04[i,j,k] + b5 * M05[i,j,k] + s[i,j] + g * peso[i,j,k]
}}}
pa2<-step(a2)
pa3<-step(a3)
pa4<-step(a4)
pa5<-step(a5)
pa6<-step(a6)
pa7<-step(a7)
pa8<-step(a8)
pb2<-step(b2)
pb3<-step(b3)
pb4<-step(b4)
pb5<-step(b5)
```

```
for (i in 1:8) {  
  for (j in 1:10)  
    { s[i,j] ~ dnorm(0,tau2)}}
```

```
tau~dchisqr(2)  
tau2~dchisqr(2)  
s1 <- sqrt(1/tau)  
s2 <- sqrt(1/tau2)  
m ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
g ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
a2 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
a3 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
a4 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
a5 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
a6 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
a7 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
a8 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
b2 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
b3 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
b4 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
b5 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)  
}
```

El programa utilizado para el análisis del HDL y el LDL fue semejante.

ANEXO 14

ENSAYO HUMANOS: MODELACIÓN DEL EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Parte 1: Situación del perfil lipídico al inicio del estudio

Para el caso del COLESTEROL el programa utilizado fue:

```
model {
  for (i in 1:30) {
    colest[i] ~ dnorm( a[ tto[i] ] , tau)
  }

  for (i in 1:2) { a[i] ~ dnorm(0.0,1.0E-04) }
  tau ~ dchisqr(1)
  s <- sqrt(1/tau)
}
```

El programa utilizado para el análisis del HDL y el LDL fue semejante.

Parte 2: Modelación del efecto de los diferentes tipos de grasa.

El programa utilizado en el caso del COLESTROL fue:

```
model {
  for (i in 1:30) {
    dcolest[i] ~ dnorm( a[i] , tau)
    a[i] <- b0 + b1*grupo[i] + b2*grasa[i] + b3*vit[i]
  }

  b0 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
  b1 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
  b2 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
  b3 ~ dnorm(0.0,1.0E-04)
  tau ~ dchisqr(1)
  s <- sqrt(1/tau)
  pb1 <-step(b1)
  pb2 <-step(b2)
  pb3 <-step(b3)
}
```

El programa utilizado para el análisis del HDL y el LDL fue semejante.

ANEXO 15

ENSAYO 1: PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR TRATAMIENTO AL INICIO Y FINAL DEL ENSAYO

Tratamiento	CONEJO	INICIALES					FINALES				
		SATURADOS		INSATURADOS			SATURADOS		INSATURADOS		
		Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolenico	Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolenico
		Porcentaje relativo									
Palma	1	33,36	11,05	27,43	22,83	0	27,43	12,71	27,87	30,12	0
	2	28,23	12,81	28,1	28,62	0	28,91	10,07	29,68	31,33	0
	3	33,76	10,86	27,91	22,86	0	31,22	10,28	28,66	25,23	0
	4	29,4	9,52	20,94	33,28	1,47	29,05	14,38	27,87	26,53	0
	5	27,71	10,71	25,17	36,4	0	29,79	13,28	25,99	27,22	0
	Media	30,49	10,99	25,91	28,80	0,29	29,28	12,14	28,01	28,09	0,00
	DE	2,87	1,18	3,01	6,10	0,66	1,38	1,90	1,35	2,55	0,00
Palma Hibrida	6	31,51	7	26	25,48	1,79	25,92	12,8	24,79	36,49	0
	7	30,7	8,88	28,4	26,25	1,88	27,69	6,23	35,34	24,22	1,82
	8	29,47	10,49	28,51	28,85	0	28,24	10,72	29,64	31,4	0
	9	30,45	8,84	33,5	20,95	1,16	23,69	9,42	33,16	32,07	0
	10	23,24	10,32	26,08	37,65	0	23,74	8,53	32,19	29,66	1,6
	Media	29,07	9,11	28,50	27,84	0,97	25,86	9,54	31,02	30,77	0,68
	DE	3,34	1,41	3,05	6,18	0,92	2,13	2,45	4,04	4,44	0,94
Soya	11	26,06	11,56	23,58	36,78	0	20,63	9,74	24,58	41,38	1,63
	12	25,96	11,03	22,14	36,47	0	22,09	14,09	22,59	39,05	0
	13	22,89	9	28,89	37,08	0	23,89	8,84	28,37	41,32	0
	14	23,13	8,86	28,84	36,99	0	21,87	10,83	24,02	41,86	0
	15	22,85	10,1	23,14	36,84		24,15	9,49	24,15	37,08	0,25
	Media	24,18	10,11	25,32	36,83	0,00	22,53	10,60	24,74	40,14	0,38
	DE	1,74	1,38	3,52	0,27	0,00	1,34	2,25	2,75	1,26	0,82
Girasol	16	33,11	12,46	14,41	37,39	0	22,33	8,5	28,27	35,29	2,72
	17	27,74	15,9	18,65	35,57	0	22,41	11,35	24,58	35,8	2,19
	18	25,09	13,99	22,44	38,48	0	25,03	9,54	24,62	36,25	2,36
	19	27,11	10,22	24,37	31,04	1,53	25,28	3,56	31,93	33,17	1,94
	20	27,22	10,34	20,1	35,19	2,04	19,91	6,16	23,24	42,92	2,72
	Media	28,05	12,58	19,99	35,53	0,71	22,99	7,82	26,53	36,69	2,39
	DE	3,00	2,43	3,81	2,85	0,99	2,22	3,03	3,55	3,68	0,34

ANEXO 16

ENSAYO 2: MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS PARÁMETROS LIPÍDICOS POR TRATAMIENTO

Tratamiento	Medición	COLESTEROL TOTAL					LDLc					HDLc				
		Momentos														
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		mg/dL														
Oliva	Media	61,4	60,2	55,9	54,4	54,2	16,1	16,3	14,9	14,4	14,7	15,8	15,4	14,9	12,9	14,7
	D.S.	10,6	10,6	10,3	10,4	9,4	5,6	5,6	5,7	5,4	5,6	4,1	5,2	5,0	4,0	3,6
Palma	Media	60,5	59,1	59,9	59,3	59,9	13,7	12,9	13,5	13,0	13,4	15,1	14,7	14,2	16	18,3
	D.S.	7,4	8,2	6,5	5,8	5,7	5,1	4,9	5,0	5,1	5,3	4,7	6,4	4,1	4,5	3,9
Oliva + Trigo	Media	62,5	59,5	56,3	52,3	45,7	18,5	17,5	16,3	14,9	13,8	17	18,4	18,8	17,9	19,8
	D.S.	11,7	12,8	23,8	14,8	15,1	8,0	7,7	7,5	7,3	7,1	5,4	9,3	4,4	3,5	3,5
Palma + Trigo	Media	61,2	56,9	55,5	52,7	51,5	16,4	15,4	14,7	13,7	13,0	16,6	17,6	18	18,8	21,3
	D.S.	12,2	9,3	9,4	7,7	8,6	7,0	6,5	6,4	5,6	5,1	3,7	4,6	4,5	3,7	3,9
Oliva + Colesterol	Media	63,4	72,6	84,2	93,5	104,3	13,8	16,4	18,4	20,4	23,0	16,6	14,9	17,8	20	20,2
	D.S.	15,2	15,1	16,4	14,0	13,9	6,7	7,6	7,4	7,5	7,5	3,4	3,0	2,3	3,1	3,8
Palma + Colesterol	Media	65,4	73,7	79,3	85,7	86,5	15,7	18,7	20,3	22,2	22,6	16,0	13,7	14,3	16,8	19,9
	D.S.	16,1	20,6	20,3	21,0	21,4	6,1	7,0	7,5	7,8	8,6	5,7	6,7	4,9	4,6	4,8
Oliva + Trigo + Colesterol	Media	60,9	68,5	76,8	83,1	89,1	15,9	18,0	20,2	21,9	23,6	16,4	17,8	18,4	18,7	20,6
	D.S.	9,4	10,1	11,0	9,9	9,3	6,3	7,1	7,8	7,9	8,0	6,8	7,4	4,8	5,0	4,7
Palma + trigo + Colesterol	Media	62,4	65,2	70,8	75	80	17,1	17,9	19,5	20,6	21,7	16	15,6	16	18,2	20,7
	D.S.	9,2	9,1	9,7	9,8	9,0	9,0	9,2	9,6	9,8	9,8	5,3	6,9	5,4	4,8	5,8