



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

**Evaluación de la disminución de colesterol sanguíneo por efecto de la ingesta de escualeno vegetal (*Amaranthus hypochondriacus*) en conejos hipercolesterolemicos.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

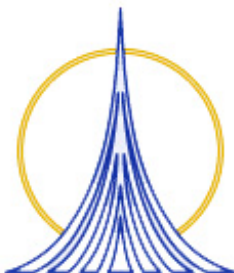
JUAN PABLO ACOSTA RIZO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MANUEL SORIANO GARCÍA

ASESOR:

QFI. ESTELA VALENCIA PLATA.



MÉXICO D. F. 2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	Q.F.I. Estela Valencia Plata
<b>Vocal</b>	Dr. Manuel Soriano García
<b>Secretario</b>	Dr. Rubén Marroquín Segura
<b>Suplente</b>	Q.F.B. Georgina E. Rios Olivera
<b>Suplente</b>	Mtra. Evangelina López Nieto

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Instituto de química UNAM. Dpto. Bioquímica 2. Ciudad Universitaria, Circuito Exterior México, D. F., C. P. 04510.

## **DIRECTOR DE TESIS:**

---

Dr. Manuel Soriano García

## **ASESOR DE TESIS:**

---

QFI. Estela Valencia Plata

## **SUSTENTANTE:**

---

Juan Pablo Acosta Rizo

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DEL Dr. MANUEL SORIANO GARCÍA.

Quiero dedicar este trabajo a:

Cada una de las bendiciones que durante este tiempo pude recibir.

a Mi familia:

Mis padres y hermanos, por que ellos han sido siempre un ejemplo de paciencia, amor, apoyo y respeto total a mis decisiones. **Mary y Andy:** que les puedo yo decir... solo gracias por tantas pero tantas cosas. **Ofelia y Pablo:** gracias por su apoyo incondicional, su tolerancia y su respeto, este trabajo es para ustedes, es un pequeño reconocimiento a todo lo que me han dado. Su motivación en todos los momentos hasta en los más difíciles fue lo que me hizo salir a delante. Sin ustedes jamás lo hubiera logrado.

**Jessica,** por creer en mi, por apoyarme en todo momento y convertirte en parte de mí. Gracias por todo.

**Gloria y Adriana,** por creer en mi y apoyarme incondicionalmente para poder continuar este sueño.

De manera muy especial, quiero dedicar este trabajo a cada una de las personas que conozco durante mi carrera ya que he adquirido algún conocimiento de cada uno de ellos pero en especial a mis amigos que representan una de las mejores alegrías y satisfacciones que alguien pueda recibir. A cada uno de ellos gracias.

Y a Dios gracias por haberme enviado cada una de las bendiciones de la vida.

QUIERO AGRADECER A:

Mi director de tesis el **Dr. Manuel Soriano García** por su apoyo incondicional y su enseñanza.

Mi asesor de tesis **QFI. Estela Valencia Plata** por brindarme asesoramiento y enseñanza incondicional.

El **Mtro. Juan Francisco Sánchez Ruiz** agradezco el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis, además también le agradezco su interés por hacer crecer día con día a la **FES-Z**.

La **Mtra. Adriana Altamirano Bautista** por el apoyo que me brindó durante mi estancia en el bioterio de la **FES-Z**.

Los profesores **QFB. José Luis Trejo** y **QFB Roberto Cruz Meléndez** por su apoyo en la solicitud de materiales, reactivos y animales.

Mi escuela la **Facultad De Estudios Superiores "Zaragoza" (FES-Z)** por que ahí aprendí tantas y tantas cosas, ahí me forme como **QFB** y fue ahí donde conocí a todas esas personas tan especiales que decidí llamar amigos. Gracias por esos momentos de alegría y de angustia, gracias por todo ese apoyo y ayuda a todas las personas que ahí trabajan.

El **instituto de química (IQ)** por brindar a estudiantes como yo su apoyo y ayuda para su fortalecimiento educativo.

El **CD. en C. José Ignacio Regla Contreras** por **HACER CRECER** a la **FES-Z** y a los alumnos de la misma, gracias por brindarnos su apoyo incondicional.

Y por último pero no con menor sentimiento doy gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por darnos el privilegio de pertenecer a una generación egresada de la máxima casa de estudios de la cual se lleva el orgullo en las venas. Llevo grabados en el corazón los colores azul y oro y deseo representarla con orgullo en todo lo que haga y nunca dejare de agradecerle mi educación.

Con respeto a la mejor universidad de México, mi admiración a la máxima casa de estudios, mi agradecimiento sincero a la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

**¡Orgullosamente UNAM!**

# **TABLA DE CONTENIDOS**

---

	pagina
<b>RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
2.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	4
2.1.1 DEFINICIÓN.....	4
2.1.2 ESTADÍSTICAS.....	6
2.2 HIPERCOLESTEROLEMIA.....	8
2.2.1 DEFINICIÓN.....	8
2.2.2 TIPOS DE HIPERCOLESTEROLEMIA.....	8
2.2.3 CAUSAS DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA.....	9
2.2.4 CONSECUENCIAS DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA.....	10
2.2.5 HIPERCOLESTEROLEMIAS GRAVES.....	11
2.2.6 TRATAMIENTOS DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA.....	13
2.3 COLESTEROL.....	15
2.3.1 DEFINICIÓN.....	15
2.3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA.....	15
2.3.3 METABOLISMO.....	16
2.3.3.1 VÍA ENDÓGENA.....	16
2.3.3.1.1 SÍNTESIS DE COLESTEROL.....	17
2.3.3.1.1.1 TRANSFORMACIÓN DE HMG-CoA EN MEVALONATO.....	17
2.3.3.1.1.2 EL MEVALONATO FORMA UNIDADES ISOPRENOIDES.....	17
2.3.3.1.1.3 LOS ISOPRENOIDES FORMAN ESCUALENO.....	19
2.3.3.1.1.4 EL ESCUALENO ES CONVERTIDO EN LANOSTEROL.....	20
2.3.3.1.1.5 EL LANOSTEROL ES CONVERTIDO EN COLESTEROL.....	21
2.3.3.2 VÍA EXÓGENA.....	21
2.4 ESCUALENO.....	22
2.4.1 DEFINICIÓN.....	22
2.4.2 ESTRUCTURA QUÍMICA.....	22
2.4.3 DISTRIBUCIÓN EN EL ORGANISMO .....	23
2.5 COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS ACEITES VEGETALES.....	24
2.5.1 ACEITES UTILIZADOS EN ALIMENTOS.....	24
2.5.2 ACEITES UTILIZADOS EN COSMÉTICA.....	27



<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>28</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 GENERALES.....	30
5.2 ESPECÍFICOS.....	30
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>7. MATERIAL Y EQUIPO.....</b>	<b>32</b>
<b>8. METODOLOGÍA.....</b>	<b>36</b>
8.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ESCUALENO.....	36
8.1.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLAS DE <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> .....	36
8.1.2 PURIFICACIÓN DEL ACEITE EXTRAÍDO DE SEMILLAS DE <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> .....	36
8.1.2.1 DESGOMADO.....	36
8.1.2.2 SAPONIFICACIÓN.....	37
8.1.2.3 PURIFICACIÓN DEL ESCUALENO.....	37
8.2 CARACTERIZACIÓN DEL ESCUALENO.....	38
8.2.1 ÍNDICE DE ACIDEZ.....	38
8.2.2 ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN.....	39
8.2.3 ÍNDICE DE YODO.....	40
8.2.4 ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	41
8.2.5 GRAVEDAD ESPECIFICA.....	41
8.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	43
8.3.1 INDUCCIÓN DE HIPERCOLESTEROLEMIA.....	43
8.3.2 TRATAMIENTOS PARA DISMINUIR EL COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS.....	43
8.3.3 MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN SUERO O PLASMA (kit Colestat enzimático, Wiener lab.).....	44
8.3.4 MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS EN SUERO O PLASMA (kit TG Color GPO/PAP AA 4x50, Wiener lab.).....	44
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
9.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ESCUALENO.....	45
9.1.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLAS DE <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> .....	45
9.1.2 PURIFICACIÓN DEL ACEITE EXTRAÍDO DE SEMILLAS DE <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> .....	45

9.1.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR).....	47
9.1.2.2 ESPECTROSCOPIA DE MASAS (EM).....	50
9.1.2.3 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA (RMN-1H).....	53
9.1.2.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN-13C).....	55
9.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	57
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>11. RECOMENDACIONES Y EXPECTATIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>13. ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## **RESUMEN**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países industrializados. Según lo reportado en el año 2003 por la Organización Mundial de la Salud, el 29.3 % de las muertes en el ámbito mundial son causadas por esta enfermedad. No es de sorprender una proporción importante de los gastos de atención de la salud. En los Estados Unidos se ha estimado que alrededor de un tercio de los costos se deben a enfermedad coronaria (EC). Los gastos anuales debidos a esta enfermedad se han estimado en más de US\$ 50 billones, y si también se incluyen los gastos indirectos relacionados fundamentalmente con la falta de productividad, este monto se duplica. Además, los gastos anuales debido a los accidentes cerebrovasculares (ACV) también son elevados, estimados en alrededor de US\$ 30 billones y casi US\$ 45 billones, si se incluyen costos indirectos, así como las costosas secuelas clínicas y procedimientos utilizados para tratar la aterosclerosis.<sup>36</sup>

Actualmente los tratamientos que existen para reducir los niveles séricos de colesterol se basan en el uso de estatinas tales como: pravastatina, lovastatina y atorvastatina: las cuales actúan inhibiendo la 3-hidroximetilglutaril coenzima A (HMG CoA)<sup>7</sup>. El tratamiento con este tipo de medicamentos puede producir efectos secundarios diferentes en cada paciente: Cefalea, erupción exantemática, prurito y alteraciones digestivas por mencionar algunas, es por ello que se hace necesaria la búsqueda de nuevos medicamentos que disminuyan la concentración del colesterol sanguíneo y que presenten efectos secundarios mínimos.

En este estudio se realizó un método de extracción y purificación de escualeno vegetal un compuesto isoprenoide presente en las semillas del amaranto, una planta cultivada en México.

Se evaluó el efecto que produce en los niveles de colesterol sanguíneo al ser administrado por vía oral en conejos Nueva Zelanda con hipercolesterolemia inducida.

La reducción de la concentración del colesterol sanguíneo fue de un 81.34% con el escualeno vegetal (*Amaranthus hypochondriacus*), 64.26% con el escualeno comercial (SIGMA<sup>®</sup>) y en un 68.19% con el aceite crudo extraído del amaranto comparándose con un 79.61% de reducción causado por la pravastatina (KENDRICK) un fármaco disponible en el mercado.

Los resultados muestran que la mayor reducción de las concentraciones del colesterol sanguíneo fue producida por el escualeno vegetal, entonces podría suponerse que la presencia de residuos como los  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocoferoles y tocotrienoles<sup>65</sup> (que se sabe también actúan en la reducción del colesterol) incrementan dicha reducción a comparación del escualeno comercial (SIGMA<sup>®</sup>), que se cree con mayor pureza por los resultados mostrados en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares representan la mayor carga de salud en los países industrializados y un problema que crece rápidamente en los países subdesarrollados, siendo la principal causa de muertes en el ámbito mundial según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el año 2003, el 29.2% de las muertes fueron causadas por esta clase de enfermedades superando a las causadas por cáncer o por la diabetes mellitus.<sup>22</sup> Una combinación de factores genéticos y adquiridos participan en esta lamentable realidad.<sup>6</sup>

Los hábitos alimentarios apropiados representan la base de la prevención y el control de varios factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular de origen isquémico (aterosclerosis), como hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia y obesidad.<sup>6, 7, 40</sup>

El colesterol total plasmático representa la cantidad total de colesterol transportado en el torrente sanguíneo. Este transporte, dada su insolubilidad, se realiza mediante la unión a proteínas, formando así las lipoproteínas plasmáticas. Según su densidad son denominadas lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), expresando habitualmente su concentración por el contenido en colesterol. Así, una parte es colesterol de “oferta” a los tejidos y es la correspondiente a la fracción LDL, llamada habitualmente “colesterol malo” y otra es colesterol que se está encaminando a su eliminación por el hígado y es la correspondiente a la fracción HDL, llamada habitualmente “colesterol bueno”.<sup>1</sup>



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### INTRODUCCIÓN

---

Las enfermedades coronarias y la enfermedad arterial periférica se han asociado a los altos niveles del colesterol y al complejo LDL-colesterol del total en suero. En la actualidad los tratamientos que existen para reducir las concentraciones de colesterol sanguíneo son a base de medicamentos hipocolesterolemicos (estatinas)<sup>36</sup> complementando con ejercicios y dietas. Los métodos dietéticos para bajar el colesterol abundan, extendiéndose de los  $\beta$ -glucanos del salvado de la avena o de los componentes solubles de la fibra. Algunos autores sugirieron que la fracción del aceite de cereales tales como cebada, avena y el arroz contuvieran inhibidores 3-hidroximetilglutaril coenzima A (HMG CoA)<sup>7</sup> reductasa, la enzima tarifa-limitadora en biosíntesis del colesterol. Dentro de la fracción aceitosa de los cereales, la  $\alpha$ - $\delta$ -tocotrienol fue identificada como agente hipocolesterolémico potente en el año de 1986.<sup>41</sup>

Los tocotrienoles son formas no saturadas, que se ha demostrado afecta la biosíntesis del colesterol en seres humanos, tiene actividad antitumoral y posee una elevada actividad antioxidante *in vitro*. Recientemente en el año 1994 se identificaron en semillas de *Amaranthus cruentus* (Guatemala México) y *Amaranthus hypochondriacus* (originario de México)  $\gamma$  y  $\delta$ -tocotrienoles además de la mayoría de tocoferoles y tocotrienoles comunes.<sup>65</sup>

Cerca de 5-9% del grano de amaranto son lípidos concentrados en la semilla. Del cual el 4-8% es escualeno.<sup>15</sup>

El Escualeno es un isoprenoide de 30 carbonos, tiene una fórmula molecular de  $C_{30}H_{50}$  con seis enlaces dobles y pertenece a la familia de los triterpenos, químicamente se le conoce como (E)-2, 6, 10, 15, 19, 23-hexametil-2, 6, 10, 14, 18, 22-tetracosahexaeno.<sup>10, 15</sup>



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### INTRODUCCIÓN

---

Algunas de las funciones del escualeno son: revitalizar las células débiles del cuerpo, su principal atributo es la protección en las células a la oxidación, a sido reportado ser inhibidor de radicales libres y de oxígeno singulete, al ser añadido con pravastatina a dosis baja intensifica la eficacia de este hipolipemiente como fármaco reductor de colesterol, por lo cual mejora la circulación de vasos sanguíneos, previniendo su endurecimiento y la deposición de placas de colesterol, se cree que tiene actividad inmune, desempeña un papel importante en la salud ocular, especialmente en las células fotorreceptoras del bastón retiniano, en la elaboración de cosméticos, colorantes, elaboración de plásticos biodegradables y es un excelente lubricante de la piel.<sup>10</sup>

El uso de este compuesto es muy importante y variado; por lo cual en el actual estudio se analiza la acción reductora del colesterol que presenta el escualeno, un compuesto presente en una semilla abundante en México como es en la familia *Amaranteacea*.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

#### 2.1.1 Definición

Las enfermedades cardiovasculares afectan al corazón haciendo más estrechas las arterias y reduciendo la cantidad de sangre que el corazón recibe, lo que hace que el esfuerzo del corazón se incremente.

Estas enfermedades muchas veces se presentan sin dolor y sin síntomas obvios. Por esa razón, a menudo no se tratan. Esto puede llevar a problemas de salud todavía más serios, como el ataque al corazón, el derrame y el daño a los riñones. Lo que es especialmente peligroso de las enfermedades cardiovasculares es que se puede padecer más de una condición a la vez sin siquiera saberlo.

Algunas condiciones asociadas con las enfermedades cardiovasculares son:

- LA ALTA PRESIÓN SANGUÍNEA O LA HIPERTENSIÓN: Esta condición con frecuencia empieza sin síntomas. Ocurre cuando la presión de la sangre contra la pared de las vías sanguíneas está constantemente más elevada de lo normal.
- ENDURECIMIENTO DE LAS ARTERIAS O ARTERIOSCLEROSIS: Esta condición ocurre cuando las arterias que van al corazón pierden la elasticidad y apertura o





## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### MARCO TEÓRICO

---

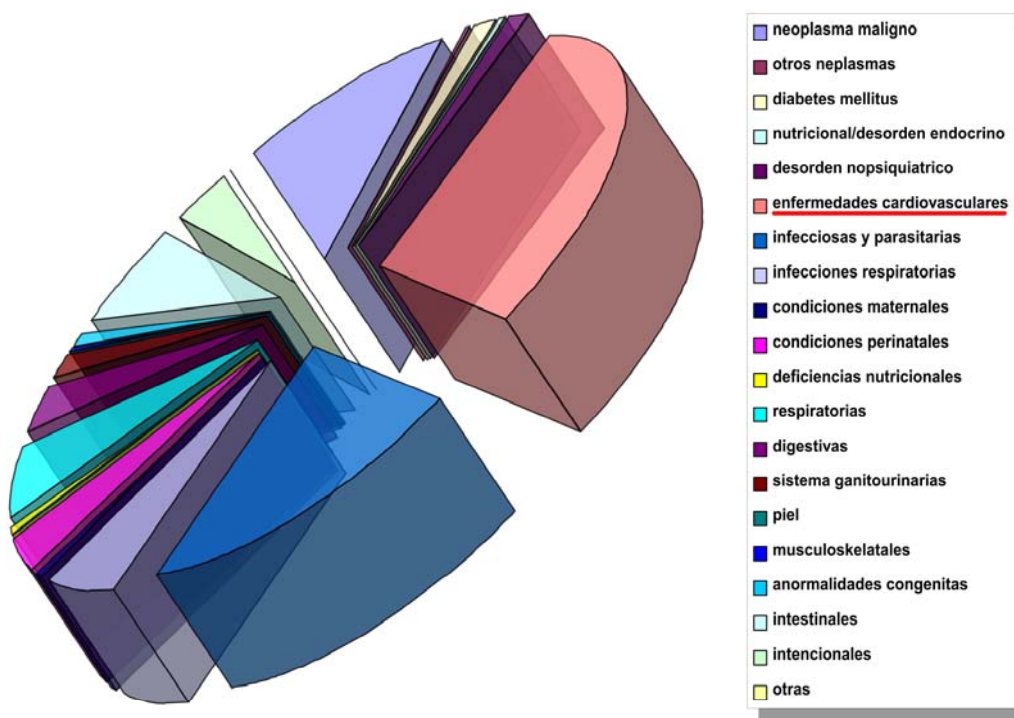
grosor de las arterias se obstruyen como resultado de la acumulación de grasa.

- BLOQUEO DE LAS ARTERIAS O ATEROSCLEROSIS: Las arterias se bloquean cuando la capa interior que les sirve de protección se daña y permite que se acumulen sustancias en el interior de la pared de la arteria. Esta acumulación está formada por colesterol, materiales de desecho de las células, materias grasas y otras sustancias.
  
- ATAQUE AL CORAZÓN: Un ataque al corazón ocurre cuando un coágulo bloquea parte o todo el abastecimiento de sangre que va directamente al músculo del corazón. Cuando se cierra por completo el flujo de sangre, el músculo del corazón empieza a morir.
  
- DERRAME: Un derrame ocurre cuando un vaso sanguíneo que abastece de sangre al cerebro se bloquea parcial o completamente, lo cual conduce a una incapacitación del cerebro debido a la reducción del flujo de sangre. El impedimento al cerebro a su vez resulta en la pérdida de movimientos del cuerpo controlados por esa parte del cerebro.
  
- INSUFICIENCIA CARDIACA CONGESTIVA: Esta condición ocurre cuando el volumen de sangre que sale en cada latido del corazón disminuye debido al funcionamiento anormal del músculo del corazón o de las estructuras de las válvulas. El abastecimiento de sangre a los tejidos del cuerpo no es suficiente para cumplir con la demanda apropiada de oxígeno que los tejidos necesitan para el trabajo biológico.



### 2.1.2 Estadísticas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en el año 2002 (Figura 2.1) el 1.7 % de las muertes ocurridas en el ámbito mundial eran a causa de la diabetes mellitus, un 2.9 % por accidentes, un 12.5 % por distintos cánceres y un 29.2 % se debían a enfermedades cardiovasculares a nivel mundial.<sup>22</sup> En México el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) reportó en el año 2002 que las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer sitio en la tasa de mortalidad con un 19 % (figura 2.2) superando las causadas por cáncer 15 %, diabetes mellitus 13 % y accidentes 5 %.<sup>47</sup>



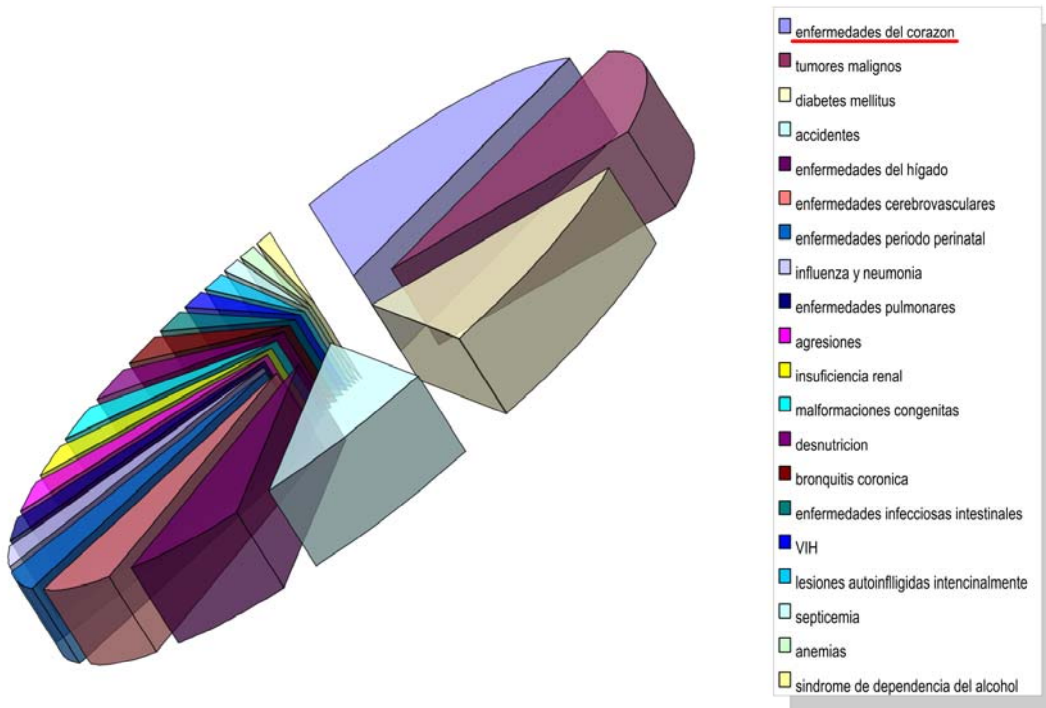
\* fuente Organización Mundial de la Salud (OMS).

Figura 2.1 Principales causas de mortalidad en el ámbito mundial en el año 2002.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### MARCO TEÓRICO



\* fuente Instituto Nacional De Estadística Geografía e Informática (INEGI).

Figura 2.2 Principales causas de mortalidad en México en el año 2002.

Las muertes causadas por las enfermedades cardiovasculares superan por mucho a las provocadas por cualquier tipo de cáncer, por accidentes y por la diabetes mellitus. Por ello debe de ser de importancia para la población evitar o controlar este tipo de enfermedades.



## 2.2 HIPERCOLESTEROLEMIA

### 2.2.1 Definición

La hipercolesterolemia consiste en la presencia de colesterol en sangre por encima de los niveles considerados normales. Este aumento se asocia a problemas coronarios, dependiendo de distintos factores tales como la dieta, el sexo, el estilo de vida y la síntesis endógena.

De esta manera, en la concentración de colesterol en sangre intervienen factores hereditarios y dietéticos, junto a otros relacionados con la actividad física.

### 2.2.2 Tipos de hipercolesterolemia

La concentración del colesterol circulante depende de la absorción intestinal, la síntesis endógena, la captación tisular, el estado del metabolismo lipoproteico y la excreción biliar. En definitiva, el nivel de colesterol dependerá de los alimentos ingeridos y la capacidad de absorción de los receptores específicos. Asimismo, se pueden distinguir dos tipos de hipercolesterolemia:

- **Primaria:** Es aquella derivada de problemas en los sistemas transportadores del colesterol y factores genéticos. En este tipo de hipercolesterolemia se enmarcan las dislipidemias.
- **Secundaria:** El aumento de colesterol se asocia a ciertas enfermedades hepáticas (hepatitis, colostasis y cirrosis), endocrinas (diabetes mellitus, hipotiroidismo y anorexia nerviosa) y renales



(síndrome nefrótico o insuficiencia renal crónica). Además, existen algunas sustancias que pueden aumentar los niveles de colesterol-LDL favoreciendo el desarrollo de hipercolesterolemia, como los esteroides anabolizantes, los progestágenos, los betabloqueantes y algunas sustancias hipertensivas.

### 2.2.3 Causas de la hipercolesterolemia

Entre los factores que influyen en el incremento del nivel de colesterol se encuentran:

- *Dietas inadecuadas:* La ingesta abusiva de grasas animales o alcohol ocasiona que el organismo consuma primero otros tipos de nutrientes favoreciendo que el colesterol no se degrade y se acumule en las arterias.
- Algunas enfermedades hepáticas, endocrinas y renales, y la administración de ciertas sustancias aumentan la síntesis de la lipoproteína LDL que transporta el colesterol perjudicial para el organismo.
- Hipercolesterolemia familiar: Se trata de una enfermedad hereditaria ocasionada por un defecto genético que impide que el colesterol LDL sea degradado, ocasionando un aumento progresivo de colesterol. En estos casos es frecuente la mortalidad temprana por infarto de miocardio o bloqueos asociados a la arterosclerosis.



#### 2.2.4 Consecuencias de la hipercolesterolemia

El desarrollo de enfermedades coronarias (EC) es la principal consecuencia del exceso de colesterol en sangre. Numerosos estudios han demostrado que las EC son más frecuentes en las poblaciones cuya alimentación es rica en grasas saturadas y colesterol, y tienen niveles séricos de colesterol elevados. Por lo contrario en las poblaciones con niveles bajos de colesterol-LDL, como Japón y China, es más baja la tasa de enfermedades coronarias.

La hipercolesterolemia está íntimamente ligada a la arterosclerosis, una alteración degenerativa que afecta a las arterias en las que se forman placas de ateroma.

Estas placas son depósitos de diversos lípidos, especialmente colesterol, proteínas y sales de calcio que obstruyen total o parcialmente los vasos de las arterias y provocan una falta de riego. Si la falta de riego se localiza en las arterias coronarias que irrigan el corazón se puede producir una angina de pecho o un infarto de miocardio. Si se produce en las arterias cerebrales son frecuentes las hemorragias y trombosis cerebrales. Cuando la obstrucción se localiza en las extremidades puede favorecer la gangrena de un miembro y, en el peor de los casos, su amputación. Asimismo, la arterosclerosis provoca aneurismas, dilataciones excesivas de la aorta que pueden provocar su rotura.

El exceso de colesterol en sangre, puede depositarse en diversos lugares del organismo, como en los ojos, donde se observa la presencia del arco senil, que es un círculo blanquecino, opaco, que aparece alrededor de la



cornea. Otros factores que facilitan la aparición de ateromas son el consumo de tabaco, la diabetes, la obesidad abdominal y la pertenencia al sexo masculino.

### 2.2.5 Hipercolesterolemias graves

Existen numerosos trastornos que pueden ocasionar hipercolesterolemias graves, si bien su desarrollo se debe normalmente a factores genéticos. Dentro de las formas más importantes de colesterolemia se encuentran la *hipercolesterolemia familiar*, la *hipercolesterolemia poligénica grave*, y la *hipercolesterolemia familiar combinada*.

*Hipercolesterolemia familiar (HF)*: Consiste en un trastorno grave fruto de una serie de mutaciones en el gen receptor de las lipoproteínas de baja densidad que transportan el colesterol. Existen formas heterocigóticas y homocigóticas. En la forma heterocigótica el enfermo sólo tiene la mitad del número normal de receptores LDL y puede detectarse en neonatos. En estos casos el nivel de colesterol se sitúa entre los 300 y 500 mg/dl. La consecuencia de este trastorno es el desarrollo de enfermedad coronaria precoz, que en los hombres aparece entre la cuarta y quinta década de vida, y en las mujeres se manifiesta una década más tarde. Según los últimos estudios, el 75% de los hombres con HF que no han sido tratados tendrán un infarto antes de los 60 años, y las mujeres antes de los 70. Además de la dieta, esta forma de hipercolesterolemia requiere tratamiento farmacológico. La mayor parte de los enfermos responden a una monoterapia con resinas, ácido nicotínico o estatinas, aunque en los casos graves es necesario dos o incluso las tres sustancias de forma combinada.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

MARCO TEORICO

---

En la forma homocigótica se da una ausencia casi total de la superficie celular que eliminan las LDL. Se da en uno de cada millón de habitantes y los afectados tienen una concentración de colesterol que oscila entre los 700 y los 1.200 mg/dl. Provoca arterosclerosis precoz grave, que puede manifestarse en las primeras décadas de vida. La escasa actividad de los receptores provoca que sean resistentes a las dietas y los fármacos destinados a reducir los niveles de colesterol.

Para tratar este trastorno se utiliza el probucol, aunque también se ha recurrido al trasplante hepático para proporcionar los receptores LDL que faltan. Este tratamiento reduce el colesterol-LDL y aumenta la respuesta a los fármacos hipocolesterolemiantes. Sin embargo, requiere un estrecho control del órgano trasplantado, lo que supone una inmunosupresión continuada.

*Hipercolesterolemia poligénica grave:* Se caracteriza por un nivel elevado de colesterol-LDL motivado por factores genéticos y ambientales. Está asociada al riesgo de enfermedades cardiovasculares y cerca del 7 por ciento de los familiares de primer grado de pacientes con una hipercolesterolemia poligénica presentan concentraciones importantes de colesterol-LDL. El nivel suele ser superior a 220 mg/dl.

*Hiperlipemia familiar combinada:* En este trastorno los afectados presentan niveles muy elevados de colesterol o de triglicéridos. Se desconoce si la causa se encuentra en uno o varios factores genéticos y no existen rasgos clínicos que permitan diagnosticarla. El colesterol total se sitúa entre los 250 y 350 mg/dl, mientras que los triglicéridos sufren importantes variaciones. El tratamiento consiste en una reducción de peso, así como la reducción de la ingesta de grasas saturadas y colesterol.





## 2.2.6 Tratamientos de la hipercolesterolemia

La modificación de la dieta es el primer paso del tratamiento y se inicia antes que la terapia con medicamentos. Las modificaciones de la dieta implican la reducción del consumo de grasas totales a menos del 30% del total de calorías consumidas. La dieta debe ser estructurada de acuerdo a las características culturales y hábitos de cada paciente. Existe una variedad de dietas pero la más recomendada es la mediterránea que consiste en aceite de oliva, incremento de frutas (excepto el coco y limitando en lo posible aceitunas y maní), verduras, hortalizas, legumbres y frutos secos, consumo abundante de cereales (trigo en forma de pan o pasta) consumo abundante de pescado, disminución de carnes y lácteos (consumir desnatados), moderado consumo de vino (dos copas), disminución de azúcares simples. La disminución en la ingesta de colesterol se logra eliminando la ingesta de la yema de huevo, las vísceras y las fuentes de grasas saturadas de origen animal. Se pueden recomendar reducciones adicionales del porcentaje de grasas en la dieta luego del período de prueba inicial, al igual que el asesoramiento dietético para ayudar a las personas en el ajuste de sus hábitos alimentarios.

El tratamiento dietético debe mantenerse por tres meses si no se observan buenos resultados comenzar tratamiento farmacológico manteniendo la dieta.

El ejercicio, en especial para inducir la pérdida de peso, aunado a una restricción en la ingesta de bebidas alcohólicas y de tabaco, puede ayudar a bajar los niveles de colesterol.

Se puede iniciar el tratamiento con medicamentos si, la dieta el ejercicio y el esfuerzo por perder peso no disminuyen los niveles de colesterol luego del



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

MARCO TEORICO

---

período de prueba. Este tratamiento debe ser de acuerdo al perfil lipídico, seguridad y efectos secundarios. La mayoría de los pacientes con cardiopatía coronaria o equivalentes de riesgo necesitan tratamiento farmacológico.

Existen medicamentos de variada índole que actúan a través de mecanismos de acción muy peculiares, los cuales pueden dividirse en tres grupos fundamentales:

- ✦ Drogas que afectan la síntesis del colesterol y lipoproteínas: ácido nicotínico policosanol y estatinas.
- ✦ Drogas que afectan la remoción de lipoproteínas de la circulación: colestiramina y colestipol.
- ✦ Drogas que afectan el metabolismo intravascular de las lipoproteínas: los fibratos.
- ✦ Muchas que tienen un mecanismo de acción diferentes, suelen combinarse para tener una mejor respuesta terapéutica. El tratamiento ideal es del grupo de las estatinas: pravastatina, lovastatina, atorvastatina, entre otras. Los tratamientos de segunda línea son las resinas: colestiramina y colestipol y niacinas.



## 2.3 COLESTEROL

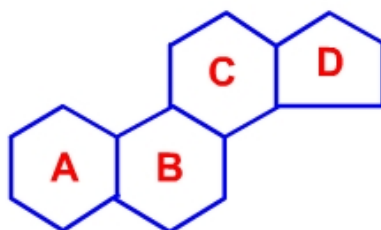
### 2.3.1 Definición

El colesterol es un componente importante en membranas plasmáticas de las células eucariontes, se encuentra en menor cantidad en membranas de los organelos, regula fluidez y permeabilidad de la membrana.

Es esencial para el crecimiento del tejido fino, producción de esteroides hormonales en las glándulas suprarrenales, ovarios y testículos, participa en la síntesis de ácidos biliares en el hígado, y a la producción de la vitamina D en piel.

### 2.3.2 Estructura Química

El colesterol es un lípido esteroide, teniendo como esqueleto arquitectónico la molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno.



**Figura 2.3** Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno.

Constituida por cuatro carbociclos condensados o fundidos, denominados A, B, C y D, que presentan varias sustituciones:



- ⊕ Dos radicales metilo en las posiciones C-10 y C-13.
- ⊕ Una cadena alifática en la posición C-17.
- ⊕ Un grupo hidroxilo en la posición C-3.
- ⊕ Una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6.

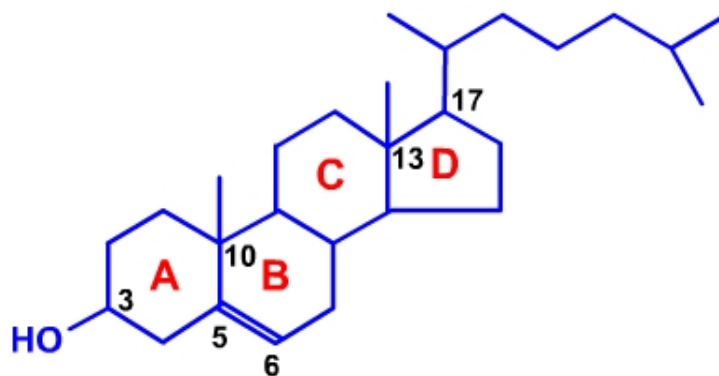


Figura 2.4 Estructura química del colesterol.

En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo, y una cola apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol es una molécula muy hidrofóbica al igual que otros lípidos, pero es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo.

### 2.3.3 Metabolismo

El ser humano obtiene el colesterol a través de dos vías: endógena y exógena.

#### 2.3.3.1 Vía endógena

En el hígado se producen dos terceras partes del colesterol total.

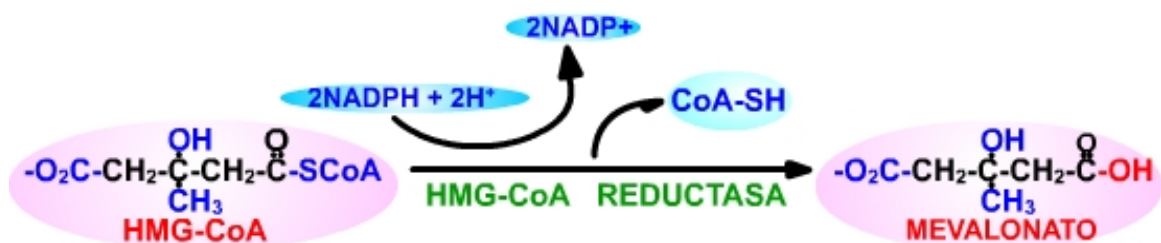


### 2.3.3.1.1 Síntesis del colesterol

La biosíntesis del colesterol en el hombre tiene lugar predominantemente en el citoplasma de los hepatocitos, además puede ser sintetizado en la mayoría de los órganos humanos tales como el intestino, la piel y el músculo. Los pasos principales de la síntesis de colesterol son:

- ✦ Transformación de HMG-CoA en mevalonato.
- ✦ El mevalonato forma unidades isoprenoides.
- ✦ Los isoprenoides forman escualeno.
- ✦ El escualeno es convertido en lanosterol.
- ✦ El lanosterol es convertido en colesterol.

**2.3.3.1.1.1 Transformación de HMG-CoA en mevalonato.** La reacción donde el **HMG-CoA** es transformado en **mevalonato** es catalizada por la **HMG-CoA reductasa**, con liberación de **CoA** y oxidación de dos moléculas de **NADPH**. El grupo tioéster de **HMG-CoA** es reducido a un alcohol. Esta enzima es el paso limitante en la síntesis del colesterol.



**2.3.3.1.1.2 El mevalonato forma unidades isoprenoides.** Este paso implica tres reacciones. Primero el **mevalonato** con ayuda de una hidrólisis de



EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

MARCO TEORICO

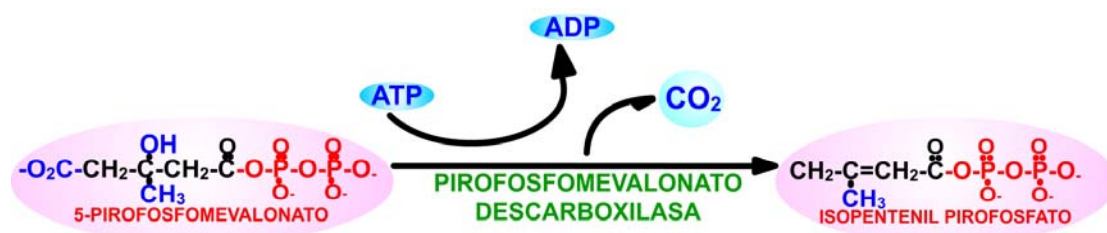
una molécula de **ATP** en presencia de la **mevalonato-5-fosfotransferasa** forma el **fosfomevalonato**.



El **fosfomevalonato** producto de la reacción anterior es transformado en **5-fosfomevalonato**, reacción catalizada por la **fosfomevalonato cinasa** y la hidrólisis de otra molécula de **ATP**, en esta reacción el grupo fosfato es convertido en pirofosfato.



Por ultimo el **5-pirofosfomevalonato** es convertido en **isopentenil pirofosfato** con una hidrólisis de otra molécula de **ATP** esta vez con liberación de **CO<sub>2</sub>**, La reacción es catalizada por la **pirofosfomevalonato descarboxilasa**, donde la molécula es descarboxilada y el alcohol resultante es deshidratado.



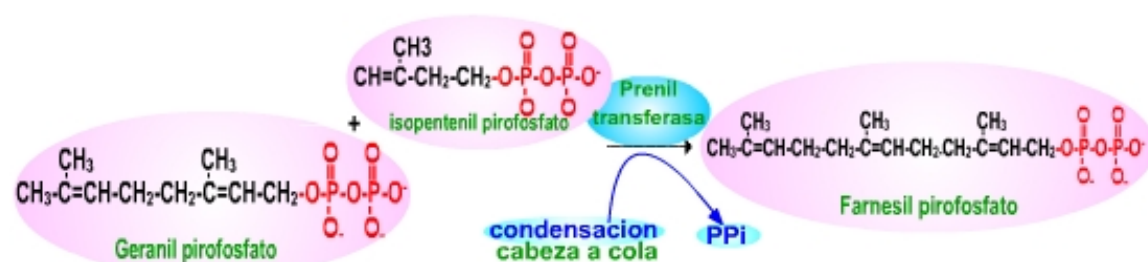


**2.3.3.1.1.3 Los isoprenoides forman escualeno.** El escualeno se forma a partir de la condensación de cuatro unidades de **isopentenil pirofosfato** y dos de **dimetilalil pirofosfato**. El proceso implica tres reacciones catalizadas por dos enzimas.

En la primera reacción la prenil transferasa cataliza la condensación de **dimetilalil pirofosfato** e **isopentenil pirofosfato** para generar el **geranil pirofosfato** en una reacción cabeza-cola.



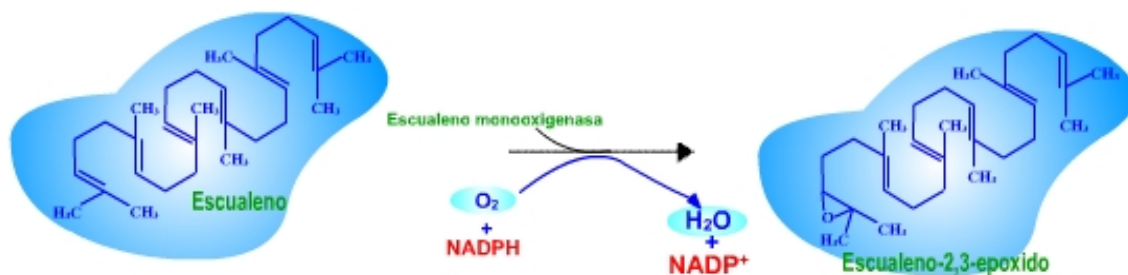
La misma enzima actúa en una segunda reacción donde cataliza la condensación del **geranil pirofosfato** e **isopentenil pirofosfato** para formar el **farnesil pirofosfato**.



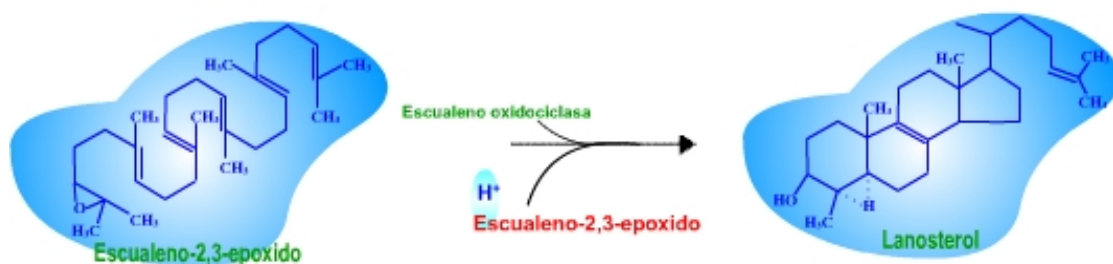
Y por último el escualeno es formado cuando se condensan dos moléculas de **farnesil pirofosfato** y la reacción es catalizada por la **escualeno sintasa**.



2.3.3.1.1.4 El escualeno es convertido en lanosterol. Este proceso se lleva a cabo en dos reacciones, primero La **escualeno epoxidasa** cataliza la oxidación del **escualeno** para formar el **escualeno-2,3-epoxido**.



Segundo la **escualeno oxidociclasa** convierte el **escualeno-2,3-epoxido** a lanosterol.







**2.3.3.1.1.5 El lanosterol es convertido en colesterol.** La transformación del **lanosterol** a **colesterol** es un proceso de 19 pasos que todavía no ha sido estudiado a detalle. Este proceso incluye una oxidación y la pérdida de tres grupos metilo, el primero se libera como formato y los otros dos como CO<sub>2</sub>.



### 2.3.3.2 Vía exógena

Directamente a través de los alimentos. Los alimentos que contienen colesterol son exclusivamente los de origen animal, sobre todo la yema de huevo, hígado, sesos y carnes rojas.



## 2.4 ESCUALENO

### 2.4.1. Definición

El escualeno (nombrado así debido a su ocurrencia en el aceite de hígado de tiburón *Squalus*) es un compuesto isoprenoide con una estructura similar al betacaroteno. Es un lípido encontrado en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y en pequeñas cantidades (0.1 a 0.7) en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura. Es un producto intermedio de la vía biosintética del colesterol. El contenido lipídico presente en el *Amaranthus hypochondriacus* es aproximadamente un 5-8 % del cual un 3.6 % es escualeno presente en sus semillas.

Con la suplementación del escualeno en la dieta pueden ser reducidos los niveles de colesterol y triglicéridos, puede ser también un aditamento útil para reforzar los efectos de algunas drogas reductoras de colesterol.

### 2.4.2. Estructura Química

El escualeno (figuras 2.5 – 2.6) es un isoprenoide de 30 átomos de carbono, tiene una fórmula molecular de  $C_{30}H_{50}$  con seis enlaces dobles y pertenece a la familia de los triterpenos, químicamente se le conoce como (E)-2, 6, 10, 15, 19, 23-hexametil-2, 6, 10, 14, 18, 22-tetracosahexaeno.

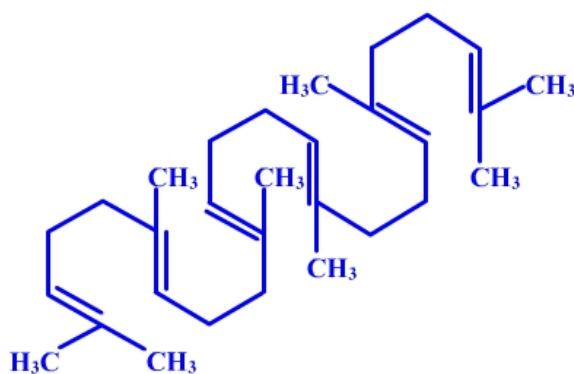


Figura 2.5 Estructura química del escualeno.

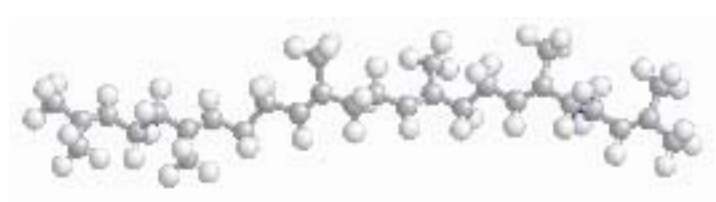


Figura 2.6 Estructura tridimensional del escualeno.

### 2.4.3. Distribución en el organismo

La piel y los tejidos finos adiposos contienen altos niveles de escualeno, mientras que en hígado, intestino grueso, y el músculo tienen niveles más bajos, cerca del 50% de escualeno es transportado por las lipoproteínas LDL y HDL, y el resto por VLDL. Sin embargo, en sujetos con hiperlipidemia tipo III<sup>1</sup>, más del 50% del escualeno es transportado por la lipoproteína VLDL, En pacientes con hipercolesterolemia familiar, aproximadamente el 75% de escualeno en suero es transportado por la lipoproteína LDL pero después de que el estímulo crónico de la síntesis del colesterol en el segmento intestinal yeyuno-íleon, una cantidad considerable del escualeno (40-60%) se acumula en la lipoproteína VLDL.

<sup>1</sup> Clasificación de las hiperlipidemias de Fredrickson



## 2.5 COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS ACEITES VEGETALES

### 2.5.1 Aceites utilizados en alimentos

La mayoría de los aceites vegetales son utilizados en el área de alimentos. Tanto para condimentar como para cocinar, su uso debe ser moderado ya que los aceites son cuerpos grasos puros, están compuestos por ácidos grasos, saturados e insaturados (estos últimos a su vez se subdividen en monoinsaturados y poliinsaturados).

Actualmente se sugiere que del total de grasas que se consuman, la tercera parte, sean poliinsaturadas, la tercera monoinsaturadas y el tercio restante saturadas, en la tabla 2.1 se observan las composiciones de grasas saturadas e insaturadas presentes en los diferentes tipos de aceite que son utilizados actualmente en la industria de los alimentos.

TIPO DE ACEITE O GRASA	SATURADA	MONOINSATURADA	POLINSATURADA
Aceite de mostaza	1	76	23
Aceite de canola	6	62	32
Aceite de almendra	8	73	19
Aceite de avellana	10	76	14
Aceite de alazor	10	13	77
Aceite de girasol	11	20	69
Aceite de semilla de uva	12	17	71
Aceite de maíz	13	25	62
Aceite de oliva	14	77	9
Aceite de sésamo	14	40	46
Aceite de nuez	14	19	67
Aceite de soya	15	24	61
Aceite de cacahuete	18	49	33
Aceite de aguacate	20	70	10



**EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.**

**MARCO TEÓRICO**

<b>Margarina (suave)</b>	20	47	33
<b>Aceite de germen de trigo</b>	20	30	50
<b>Aceite de semilla de algodón</b>	24	26	50
<b>Aceite de amaranto</b>	25	38	37
<b>Manteca de cerdo</b>	41	47	12
<b>Aceite de palma</b>	52	38	10
<b>Manteca de cacao</b>	62	35	3
<b>Mantequilla</b>	66	30	4
<b>Margarina (fuerte)</b>	80	14	16
<b>Aceite del núcleo de la palma</b>	86	12	2
<b>Aceite de coco</b>	92	6	2

**Tabla 2.1** Composición de grasas en distintos tipos aceites.

Puede observarse en la tabla 2.1 que las grasas de origen animal y los aceites tropicales como el de palma, núcleo de la palma y de coco contienen alto contenido de grasa saturada, la cual su consumo excesivo en la dieta puede ocasionar un aumento en los niveles de colesterol sanguíneo, caso contrario en los aceites de oliva, girasol y mostaza que contienen en mayor proporción grasas insaturadas las cuales ayudan a reducir los niveles de colesterol en la sangre reduciendo el riesgo de enfermedades coronarias.

En la tabla 2.2 puede observarse la composición de los ácidos grasos saturados (palmitico y estearico) y de los insaturados (oleico y linoleico) presentes en mayor proporción en los distintos tipos de aceites.

<b>TIPO DE ACEITE</b>	<b>PALMITICO</b>	<b>ESTEARICO</b>	<b>OLEICO</b>	<b>LINOLEICO</b>
<b>Aguacate</b>	7 - 32	1.5	36 - 80	6 - 18
<b>Almendra</b>	6 - 8	1.2	64 - 82	0.1
<b>Amaranto</b>	20	3	22 - 26	46 - 50
<b>Coco</b>	6 - 11	1 - 4	4 - 11	1 - 2
<b>Maíz</b>	12 - 14	2 - 3	29 - 37	46 - 56
<b>Nuez</b>	6 - 8	1 - 3	14 - 21	54 - 65
<b>Oliva</b>	8 - 20	0 - 4	56 - 83	4 - 20
<b>Palma</b>	6 - 11	1 - 4	4 - 11	1 - 2
<b>Semilla de uva</b>	5 - 11	3 - 6	12 - 28	58 - 78

**Tabla 2.2** Composición de ácidos grasos de diferentes aceites comestibles.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### MARCO TEÓRICO

Los aceites vegetales comestibles deberán cumplir con:

- ✦ Especificaciones sensoriales (olor, sabor y apariencia).
- ✦ Físicas (gravedad específica, índice de refracción).
- ✦ Y químicas (índices de acidez, de saponificación y de yodo).

En la tabla 2.3 se muestran los valores específicos de diferentes tipos de aceites vegetales extraídos en la actualidad.

TIPO DE ACEITE	ÍNDICE DE ACIDEZ	ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN	ÍNDICE DE YODO	ÍNDICE DE REFRACCIÓN (20°C)	GRAVEDAD ESPECIFICA (20 °C)
<b>Aguacate</b>	0 – 4.0	177-198	80 – 95	1.4680 – 1.4720	0.905 – 0.925
<b>Algodón</b>	0 – 0.6	189 - 198	99 - 119	1.4580 – 1.4660	0.918 – 0.926
<b>Amaranto</b>	0 - 0.2	< 200	< 40	1.4510 – 1.4550	0.807 – 0.810
<b>Girasol</b>	0 – 0.6	188 - 194	110 - 143	1.467 – 1.469	0.918 – 0.923
<b>Oliva</b>	0 - 7	184 - 196	75 - 94	1.4677 – 1.4705	0.910 – 0.916
<b>Palma</b>	0 – 1.0	250 – 258	0 – 10	-	0.900 – 0.940
<b>Soya</b>	0 – 0.6	189 - 195	120 – 143	1.466 – 1.4700	0.919 – 0.925
<b>Almendra</b>	-	-	94 –105	1.4640 – 1.4700	0.900 – 0.920
<b>Cacahuete</b>	0 – 0.6	187 - 196	80 - 106	1.460 – 1.465	0.914 – 0.917
<b>Semilla de uva</b>	0 – 3.0	-	125 - 142	1.4730 – 1.4760	0.900 – 0.920
<b>Nuez</b>	0 – 5.0	0.5 – 1.0	140 – 150	1.4750 – 1.4780	0.910 – 0.930
<b>Coco</b>	0 –1.0	250 – 258	0 – 10	-	0.900 – 0.940
<b>Maíz</b>	0 – 0.6	187 - 195	103 - 130	1.4735 – 1.4785	0.917 – 0.925

**Tabla 2.3** Características fisicoquímicas de diferentes aceites vegetales.



### 2.5.2 Aceites utilizados en cosmética

Los aceites vegetales son materias de gran poder emoliente y rápida absorción, con propiedades dermatológicas comprobadas. Tienen una excelente afinidad con la piel y no son oclusivos ni comedogénicos. Son la verdadera alternativa a las grasas derivadas del petróleo y de los animales y su utilización en ciertas fórmulas permite a los profesionales personalizarlas según el tratamiento.

La calidad de los aceites depende básicamente de la naturaleza de los ácidos grasos que los componen, ya que alguno de estos son indispensables para el equilibrio nutricional de la piel. El organismo no puede asegurar su síntesis, por eso se les denominó ácidos grasos esenciales.

Los aceites vegetales son ricos en ácidos grasos esenciales, por ello tienen una actividad de reestructuración y refuerza la barrera cutánea. Ayuda así a mantener la epidermis hidratada. Los aceites vegetales más ricos en ácidos grasos no saturados, en particular monoinsaturados y poliinsaturados son: Aguacate, Avellana, Germen de trigo, Sésamo.



### 3. ANTECEDENTES

El amaranto se ha utilizado desde la antigüedad por tener gran potencial alimenticio.<sup>25</sup> En el se contiene un alto contenido de proteína, fibra, lisina, magnesio, calcio, y escualeno.<sup>25,65</sup> Se han realizado investigaciones en torno a la actividad reductora del colesterol en modelos con animales y seres humanos, usando diferentes especies de amaranto y procesados en diferentes formas, obteniéndose resultados contradictorios.<sup>2, 13, 39, 64, 65</sup>

El amaranto presenta características para reducir las concentraciones del colesterol sanguíneo, esto se ha encontrado en experimentos realizados en modelos de animales.<sup>2, 13, 39, 64, 65</sup> Sin embargo, en un ensayo clínico humano<sup>65</sup> y un estudio experimental en humanos<sup>65</sup> los resultados no eran evidentes.

Estudios realizados en pollos hipercolesterolémicos<sup>2</sup>, en conejos<sup>39</sup> y hámsteres<sup>65</sup> demostraron que las semillas y el aceite de amaranto tiene características para reducir el colesterol sanguíneo aunque las semillas y aceites no afectan el metabolismo del colesterol de igual manera.<sup>65</sup>

Estudios realizados en hámsteres sugieren que el escualeno presenta actividad en la reducción de las concentraciones del colesterol sanguíneo. Estos estudios podrían sugerir que la reducción del colesterol que existe al implementarse dietas con semillas y aceites de amaranto es debida a la presencia de escualeno.<sup>10, 12</sup>





#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a la numerosa población que presentan altas concentraciones de colesterol sanguíneo, resulta necesaria la búsqueda alternativas con las que se puedan reducir las concentraciones del colesterol sanguíneo, se pretende evaluar el efecto reductor del escualeno vegetal extraído de semillas de *Amaranthus Hypochondriacus* ya que existe evidencia experimental que el aceite total del amaranto reduce el nivel de colesterol sanguíneo en diferentes especies animales.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que tiene el escualeno vegetal extraído y purificado de *Amaranthus hypochondriacus* sobre los niveles de colesterol sanguíneo en conejos Nueva Zelanda.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✦ Extraer y purificar escualeno de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.
- ✦ Cuantificar y caracterizar el escualeno de origen vegetal.
- ✦ Inducir una hipercolesterolemia a conejos machos Nueva Zelanda.
- ✦ Cuantificar la concentración de colesterol y triglicéridos en sangre de conejos hipercolesterolemicos, antes, durante y después del tratamiento con el escualeno.
- ✦ Analizar los resultados obtenidos en términos de la acción reductora del colesterol debida a la ingesta de escualeno vegetal.



## 6. HIPÓTESIS

Se espera que al administrar una dosis de escualeno extraído y purificado de *Amaranthus hypochondriacus* en la dieta diaria a un grupo de conejos con hipercolesterolemia inducida, se logre una disminución en los niveles de colesterol sanguíneo.



## 7. MATERIAL Y EQUIPO.

### Material vegetal

500 g de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.

### Material biológico

- 15 conejos machos Nueva Zelanda con un peso entre 2.5 y 3 Kg.
- Muestras de sangre venosa y plasma de los grupos de estudio.

### MATERIALES

- Adaptador 24/40
- Agujas 21 G x 33 mm (PLASTIPACK<sup>®</sup>)
- Capilares
- Celda espectrofotométrica (PERKIN ELMER)
- Columna (PYREX<sup>®</sup>)
- Embudo de tallo corto
- Espátula de acero inoxidable
- Gradillas
- Jeringas 3 mL (PLASTIPACK<sup>®</sup>)
- Matraces balón fondo plano 100 mL (KIMAX<sup>®</sup>)
- Matraz balón fondo plano 24/40 2000 mL (PIREX<sup>®</sup>)
- Minispín (EPPENDORF)
- Placas de sílica gel (ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub>, MACHEREY-NAGEL)



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### MATERIAL Y EQUIPO

---

- Pinzas de acero inoxidable
- Pinzas de tres dedos
- Pipetas Pasteur
- Probetas graduadas 100 y 500 mL (PYREX<sup>®</sup>)
- Puntas de plástico para micropipeta
- Recipientes de plástico
- Refrigerante 24/40 (PYREX<sup>®</sup>)
- Soporte universal
- Torundas de algodón
- Tubos para centrifuga (LABCON<sup>®</sup>)
- Vasos de precipitados 100 y 1000 mL (KIMAX<sup>®</sup>)

### EQUIPOS

- Baño maría (ISOTEMP 210)
- Bortrex (Super-mixer, LAB-LINE INSTRUMENTS)
- Centrífuga (Sorvall<sup>®</sup> RT6000 Refrigerated Centrifuge, DUPONT)
- Congelador (NIETO)
- Parrilla de agitación y calentamiento (Cimarec 2, TERMOLINE)
- Rotavapor (BÜCHI)
- Ultracentrifuga (Minispin, EPPENDORE)
- Molino (BRAUN)

### INSTRUMENTOS

- Balanza analítica (OHAUS<sup>®</sup> LS200)
- Balanza de dos platos (OHAUS<sup>®</sup>)



**EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.**

**MATERIAL Y EQUIPO**

- Espectrofotómetro (Spectronic genesis 2, MILTON ROY)
  
- Espectro infrarrojo (Tensor 27, BRUKER)
- Matraz volumétrico 1000 mL (PYREX<sup>®</sup>)
- Micropipetas 20  $\mu$ L, 1 mL (BRAND<sup>®</sup>)
- Picnómetro de líquidos 25 mL con termómetro (GAY-LUSSAC)
- Pipetas graduadas 1, 5, 10 y 25 mL (KIMAX<sup>®</sup>)
- Potenciómetro (CONDUCTRONIC pH120)
- Refractómetro (1T, ATAGO)
- Refractómetro (Hand refractometer, ATAGO)
- Termómetro -20 a 150 °C (BRANAN<sup>®</sup>)

**REACTIVOS**

- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido clorhídrico 0.5 N (MERCK<sup>®</sup>)
- Almidón indicador (MERCK<sup>®</sup>)
- Caseína (CHISHOLM)
- Cloroformo
- Escualeno (SIGMA)
- Etanol
- Fenolftaleína 1.0 % (SIGMA<sup>®</sup>)
- Hexano
- Hidróxido de potasio (SIGMA<sup>®</sup>)
- Hidróxido de potasio 0.1 N (MERCK<sup>®</sup>)
- Hidróxido de sodio (MERCK<sup>®</sup>)
- Kit Colestat enzimático (WIENER LAB.)
  - o Reactivo 4-AF (solución de 4-aminofenazona 25 mmol/L)



**EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.**

**MATERIAL Y EQUIPO**

---

- Reactivo de fenol (solución de fenol 55 mmol/L)
  
- Estándar (solución de colesterol 2 g/L)
- Enzimas (suspensión conteniendo lipasa fungal 300 U/mL, colesterol oxidasa (CHOD) 3 U/mL y peroxidasa (POD) 20 U/mL)
- Kit TG Color GPO/PAP AA (WIENER LAB.)
  - Buffer (solución de buffer Good conteniendo clorofenol, pH 7,5)
  - Estándar (solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivale a 2 g/L de trioleína)
  - Enzimas (viales conteniendo lipoprotein lipasa, glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF))
- Reactivo de Hanus (SIGMA<sup>®</sup>)
- Silica gel 60 (SIGMA<sup>®</sup>)
- Sulfato cerico (TECSIQUIM)
- Tiosulfato de sodio 0.1 N (SIGMA<sup>®</sup>)
- Yoduro de potasio 15% (SIGMA<sup>®</sup>)



## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ESCUALENO

#### 8.1.1 Extracción del aceite de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.

Se limpiaron las semillas de amaranto por tamizado (malla 30) para eliminar toda partícula extraña, se molió 120 g de la semilla ya limpia en un molino para café (BRAUN KSM2) durante 10 minutos obteniendo una harina fina la cual fue puesta en un matraz balón de fondo plano de 1000 mL con una porción de 600 mL de hexano (rango de ebullición 68-70 °C), el matraz fue montado en un equipo para reflujo y agitación durante 24 Hrs. Concluido el tiempo se separa el liquido de la harina por medio de filtración (papel filtro grado 1) y se recupero el hexano en un equipo rotavapor (BÜCHI) obteniéndose un aceite color amarillo con olor característico.<sup>15</sup>

#### 8.1.2 Purificación del aceite extraído de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.

##### 8.1.2.1 Desgomado

De acuerdo a la cantidad de aceite extraído se le agrega el 1 % de agua destilada y se calienta en baño Maria (60 °C) durante 15 minutos para después por centrifugación (3500 rpm / 5 minutos) separar las gomas del resto del aceite.





### 8.1.2.2 Saponificación

De acuerdo a la cantidad de aceite se le agrega la misma cantidad de KOH (20%) y se calienta durante 15 minutos en baño María (90 °C) y después por centrifugación (3500 rpm / 5 minutos) se separan los saponificables de los insaponificables.

### 8.1.2.3 Purificación del escualeno

La porción de insaponificables fue puesta en una columna cromatográfica utilizando gel sílice (300 g, malla 60, SIGMA®) como fase estacionaria y hexano como fase móvil. Se puso a eluir la muestra en la columna con un flujo de 1.5 mL/min. Recolectando porciones (100 mL) en matraces balón de 150 mL. Para identificar al escualeno en las porciones se utilizó la cromatografía en capa fina (CCF) utilizando laminillas de sílice (ALUGRAM®SIL G/UV<sub>254</sub>, MACHEREY-NAGEL) y comparando con un estándar de escualeno (SIGMA®) eluyendo con una mezcla hexano-acetato de etilo (6:1, v/v). Las manchas son reveladas con sulfato cérico. Las porciones en las que se contenía escualeno fueron juntadas y se evaporó el hexano en un rotavapor (BÜCHI). Se concentró el aceite al cual se le hicieron pruebas características de identificación.<sup>15</sup>



## 8.2 CARACTERIZACIÓN DEL ESCUALENO

### 8.2.1 Índice de acidez<sup>31</sup>

A 10 g de la muestra, seca y filtrada, contenida en un matraz Erlenmeyer de 300 mL, se le agregan 16 mL de alcohol etílico previamente neutralizado; si la disolución de los ácidos grasos libres no es completa en frío, se calienta suavemente el matraz en baño de vapor hasta disolución completa, y después se agrega 1 mL de fenolftaleína; se titula la mezcla con una solución de hidróxido de potasio 0.1 N previamente valorada, agitando frecuentemente hasta que una coloración rosada persista durante 30 segundos.

#### Expresión de resultados

El resultado se expresa en miligramos de hidróxido de potasio de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56.1 \times N \times V}{P}$$

En donde:

56.1 = Equivalente químico de la potasa.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de potasio.

V = Mililitros de solución valorada de hidróxido de potasio gastados en la titulación de la muestra.

P = Masa de la muestra en gramos.<sup>31</sup>



### 8.2.2 Índice de saponificación<sup>32</sup>

Se colocan 5 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer de cuello esmerilado, se le agregan, 50 mL de hidróxido de potasio en solución alcohólica exactamente medidos con pipeta volumétrica en un tiempo definido.

Al matraz, se le adapta un refrigerante de reflujo y se coloca en un baño maría hirviente durante 60 minutos, agitándolo frecuentemente.

Una vez terminada la saponificación de 60 minutos se le agrega 1 mL de solución indicadora de fenolftaleína al 1.0% titulándose en frío, con ácido clorhídrico 0.5 N; para observar con claridad y precisión el punto final, considerándose como tal cuando después de transcurrir medio minuto de que se agrega la última gota del ácido clorhídrico 0.5 N se produce la decoloración.

Se hace una prueba testigo usando la misma cantidad de reactivo procurando que el tiempo de descarga de las pipetas sea semejante al de la muestra.

#### Expresión de resultados

Para obtener el índice de saponificación se aplica la siguiente expresión:

$$I. S. = \frac{V_1 - V}{P} \times 28.05$$

En donde:

I. S = Índice de saponificación.

$V_1$  = Mililitros de solución de ácido clorhídrico 0.5 N empleados en la titulación del testigo.

V = Mililitros de ácido clorhídrico 0.5 N empleados en la titulación de la muestra.

P = Masa de la muestra en gramos.

28.05 = Miligramos de hidróxido de potasio equivalente a 1 mL de ácido clorhídrico 0.5 N.<sup>32</sup>



### 8.2.3 Índice de yodo<sup>33</sup>

Se colocan 10 g de muestra en un matraz para yodo de 200 mL con tapón de vidrio esmerilado, se adicionan 100 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) con ayuda de una pipeta y girando el matraz, este se deja en reposo durante una hora. Al concluir esta se agita y se filtra a través de papel filtro (grado 1) de 12.5 cm. Tomar dos alícuotas de 20 mL,

Una de las alícuotas se pasa a un cristizador tarado de 50 x 35 mm, se evapora el disolvente en baño maría, se seca el cristizador y se lleva a 373 °K (100 °C) durante una hora dejando enfriar y pesarlo. El peso obtenido se usa para calcular el índice de yodo.

La otra porción de 20 mL se coloca en un matraz para yodo y se le agregan 25 mL del reactivo de Hanus (SIGMA) y se deja durante una hora, agitando de vez en cuando.

Agregar 10 mL de la solución de yoduro de potasio al 15% y 100 mL de agua fría previamente hervida. Titular el yodo con tiosulfato de sodio 0.1 N dejándolo caer lentamente y agitando hasta desaparición del color amarillo, agregar 2 mL de la solución indicadora de almidón y continuar titulando hasta que a coloración azul haya desaparecido completamente. Al final de la titulación se agita vigorosamente el matraz bien tapado para ver si todo el yodo ya se ha titulado.

Hacer un ensayo en blanco, siguiendo el procedimiento anterior, excluyendo la muestra.

#### Expresión de resultados

Calcular el índice de yodo mediante la siguiente expresión:

$$I = \frac{(V_t - V_m) N \times 12.69}{m}$$

En donde:

I = Índice de yodo

$V_t$  = Volumen de solución de tiosulfato de sodio gastado en la titulación del blanco, en mL.

$V_m$  = Volumen de solución de tiosulfato de sodio gastado en la titulación de la muestra, en mL.



N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

12.69 = Equivalente del yodo

m = Masa de la muestra en gramos.<sup>33</sup>

#### 8.2.4 Índice de refracción<sup>30</sup>

Se enciende el refractómetro (1T, ATAGO); se inserta el termómetro y se ajusta la circulación de agua, de manera que los prismas adquieran la temperatura de 20°C. Los prismas se limpian con etanol y se dejan secar.

Se coloca una gota de la muestra sobre el prisma inferior y se presiona con el superior hasta que ambos queden juntos. Se ajusta la luz de manera que penetre en el aparato. Se enfoca el ocular sobre las líneas transversales cruzadas y sobre los lentes de la escala.

Moviendo el brazo del prisma se encuentra que la parte baja del campo está oscura y la superior iluminada. En general la línea divisoria siempre es colorida. Se gira la cremallera de ajuste cromático, hasta que aparezca una línea fina de separación perfectamente definida.

Se mueve el brazo del prisma hasta que la línea de separación se encuentre en la intersección del retículo.

Se toman varias lecturas del índice de refracción en la escala hasta la cuarta cifra decimal.<sup>30</sup>

#### 8.2.5 Gravedad específica<sup>34</sup>

Se limpia cuidadosamente el picnómetro con etanol y éter etílico. Se seca interiormente utilizando una corriente de aire seco y exteriormente con un paño o con papel filtro.

Se determina la masa del picnómetro completo con la precisión de 0.1 mg; se llena con agua destilada evitando la formación de burbujas de aire se coloca el termómetro y se deja destapada la rama del capilar.

Se sumerge en un baño de agua a 25°C ± 0.2°C durante 30 minutos controlando la temperatura del baño con el termómetro del picnómetro cuando se alcance la temperatura deseada se enrasa la rama capilar del picnómetro con agua destilada a la misma temperatura y se tapa; se extrae del baño, se limpia, se seca exteriormente y se determina su masa con la precisión de 0.1 mg.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### METODOLOGIA

---

El picnómetro se vacía y luego se lava con etanol y éter etílico. Se seca interiormente utilizando una corriente de aire seco y exteriormente con un paño seco o con papel de filtro.

Se llena el picnómetro con el aceite vegetal homogeneizado, evitando la formación de burbujas de aire; se coloca el termómetro y se deja destapada la rama del capilar, se sumerge en el baño de agua a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos controlando la temperatura del baño con el termómetro del picnómetro.

Cuando se alcance la temperatura deseada, se enrasa la rama del capilar del picnómetro con el aceite vegetal a la misma temperatura y se tapa, se extrae del baño, se limpia, se seca exteriormente y se determina su masa con la precisión de 0.1 mg.

#### Expresión de resultados

La densidad relativa se calcula con las siguientes expresiones:

$$G_1 = M_1 - M$$

$$G_2 = M_2 - M$$

$$\delta = \frac{G_1}{G_2}$$

En donde:

$M_1$  = Masa del picnómetro con muestra.

$M_2$  = Masa del picnómetro con agua,

$M$  = Masa del picnómetro vacío.

$G_1$  = Masa neta del aceite.

$G_2$  = Masa neta del agua.

$\delta$  = Densidad relativa del aceite a temperatura  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) con respecto al agua de la misma temperatura.

La expresión de los resultados se hace hasta la tercera cifra decimal.<sup>34</sup>



## 8.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS

### 8.3.1 Inducción de hipercolesterolemia

Se disolvieron 990 g de caseína (CHISHOLM) en 3,300 mL de agua a temperatura ambiente se pusieron en agitación y calentamiento hasta alcanzar una temperatura entre 45-49 °C alcanzada la temperatura se llevo a un pH de 7 con una solución de hidróxido de sodio al 30 % y se mantuvo la agitación y la temperatura hasta que estuviera totalmente diluida la caseína y se observara una solución homogénea, se dejo enfriar a temperatura ambiente y se les dio a beber durante 50 días a un grupo 11 conejos.<sup>39</sup>

### 8.3.2 Tratamientos para disminuir el colesterol y triglicéridos

Se utilizaron 15 conejos machos Nueva Zelanda (2½ - 3 Kg.), 4 fueron considerados control negativo no tuvieron ningún tratamiento, a los 11 restantes se les indujo una hipercolesterolemia administrándoles una dieta rica en caseína<sup>19,48,54</sup>, una vez que presentaron hipercolesterolemia se dividieron en 5 grupos. El grupo A (2 conejos) se le administro una dosis de 0.5 mg/día de escualeno vegetal extraído de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, al grupo B (2 conejos) se le administró una dosis de 0.5 mg/día de escualeno comercial (SIGMA®), al grupo C (2 conejos) se le administró una dosis de 10 mg/día de Pravastatina (KENDRICK Laboratorios) al grupo D se le administró una dosis de 0.5 mg/día de aceite crudo extraído de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y al grupo E (3 conejos) no les fue administrado nada. Los tratamientos fueron durante 30 días y teniendo seguimiento en los niveles de colesterol y triglicéridos.<sup>1,39</sup>



### 8.3.3 Método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma (kit Colestat enzimático, Wiener lab.)<sup>62</sup>

Con una jeringa se obtuvo una muestra sanguínea (1.0 mL) de la oreja del conejo, se separó el suero del paquete globular por centrifugación (3500 rpm/10min.). Se etiquetaron 17 tubos como B (Blanco), S (Standard) y M<sub>1-15</sub> (Muestras) y se le colocaron, al S 20 µL de Standard, a M<sub>1-15</sub> 20 µL de cada una de las muestras según correspondía y a todos los tubos incluyendo al blanco se les colocó 2 mL de reactivo de trabajo para la determinación de colesterol (anexo 1) se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Se determinó la absorbancia de las muestras a 505 nm empleando un espectrofotómetro (SPECTRONIC GENESYS 2, MILTON ROY) previamente se equilibró con una solución blanco.<sup>62</sup>

### 8.3.4 Método enzimático para la determinación de triglicéridos en suero o plasma (kit TG Color GPO/PAP AA 4x50, Wiener lab.)<sup>63</sup>

Con una jeringa se obtuvo una muestra sanguínea (1.0 mL) de la oreja del conejo, se separó el suero del paquete globular por centrifugación (3500 rpm/10min.). Se etiquetaron 17 tubos como B (Blanco), S (Standard) y M<sub>1-15</sub> (Muestras) y se le colocaron, al S 10 µL de Standard, a M<sub>1-15</sub> 10 µL de cada una de las muestras según correspondía y a todos los tubos incluyendo al blanco se les colocó 1 mL de reactivo de trabajo para la determinación de triglicéridos (anexo 2) se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Se leyeron en el espectrofotómetro (SPECTRONIC GENESYS 2, MILTON ROY) a 505 nm. Llevando el aparato a cero con agua destilada.<sup>63</sup>





## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ESCUALENO

#### 9.1.1 Extracción del aceite de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.

En la industria generalmente se requieren métodos de extracción que brinden altos rendimientos. En el presente estudio fueron realizadas diferentes técnicas de extracción de aceites contenidos en las semillas vegetales, siendo la técnica de extracción con disolventes con la que se logró obtener un rendimiento de 4.02 % de aceite crudo de amaranto utilizando como disolvente el hexano.

#### 9.1.2 Purificación del aceite extraído de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.

Para purificar el escualeno contenido en el aceite crudo de amaranto primero fue necesario quitar las gomas y los lípidos saponificables (ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico), el material insaponificable se hizo pasar por una columna de sílica 60, esto para separar el escualeno de la demás materia insaponificable (hidrocarburos, tocoferoles, esteroides, terpenos y tocotrienoles) obteniéndose un 0.41% de rendimiento de escualeno del total de las semillas utilizadas. Todo el procedimiento de purificación fue seguido con cromatografía de capa fina.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al producto final se le hizo una caracterización y se obtuvieron los siguientes resultados:

PRUEBA	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES*
Gravedad específica (20 °C):	<b>0.8012</b> ± <b>0.00017321</b>	0.807 - 0.810
Índice de refracción (20°C):	<b>1.457</b> ± <b>0</b>	1.4510 - 1.4550
Índice de acidez:	<b>0.1309</b> ± <b>0.03238935</b>	0.2 max
Índice de yodo:	<b>1.69435</b> ± <b>0.00407032</b>	4.0 max
Índice de saponificación:	<b>0.748</b> ± <b>0.3238935</b>	2.0 max

**Tabla 9.1** Resultados de la caracterización de escualeno.

\* VALORES DE REFERENCIA (Sophim)

En la tabla 9.1 se observa que los resultados obtenidos en las pruebas de caracterización del escualeno cumplen con las especificaciones dadas de un estándar de escualeno presente en la industria (sophim) a excepción de el índice de refracción del cual resulta un valor elevado por lo que se comparo haciendo la misma prueba a un estándar de escualeno marca SIGMA.



### 9.1.2.1 Espectroscopia de infrarrojo (IR)

En la figura 9.1 se muestra el espectro de IR realizado a un estándar de escualeno (obtenido en SIGMA chemical, USA) en el cual son observadas tres bandas principales entre los  $2966.46\text{ cm}^{-1}$  y  $2853.95\text{ cm}^{-1}$  que son correspondientes a enlaces C-H, en los  $1667.87\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que representa los enlaces C=C y la contribución de los enlaces C-C se encuentra en los  $1223.16\text{ cm}^{-1}$ . Esto representa la huella digital del escualeno.

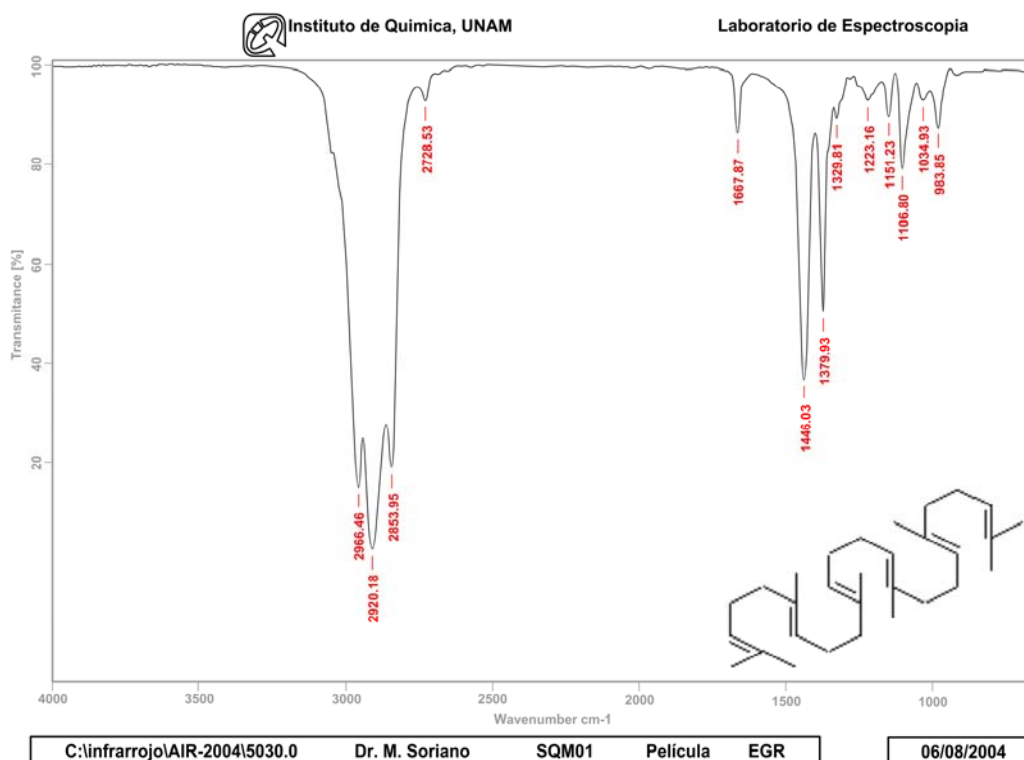


Figura 9.1 Espectro de IR del estándar de escualeno (SIGMA).



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro de IR del aceite crudo de amaranto (figura 9.2) mostró lectura a los  $3470.58\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a el enlace O-H tres bandas principales entre los  $2854.35\text{ cm}^{-1}$  y  $3008.57\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a enlaces C-H, en los  $1746.48\text{ cm}^{-1}$  se percibe una banda que representa C=C y el enlace C-C se encuentra en los  $1237.40\text{ cm}^{-1}$ . La presencia del enlace O-H así como la intensidad en los enlaces C=C pueden ser debido a la presencia de tocoferoles, terpenos y tocotrienoles que aun no han sido separados.

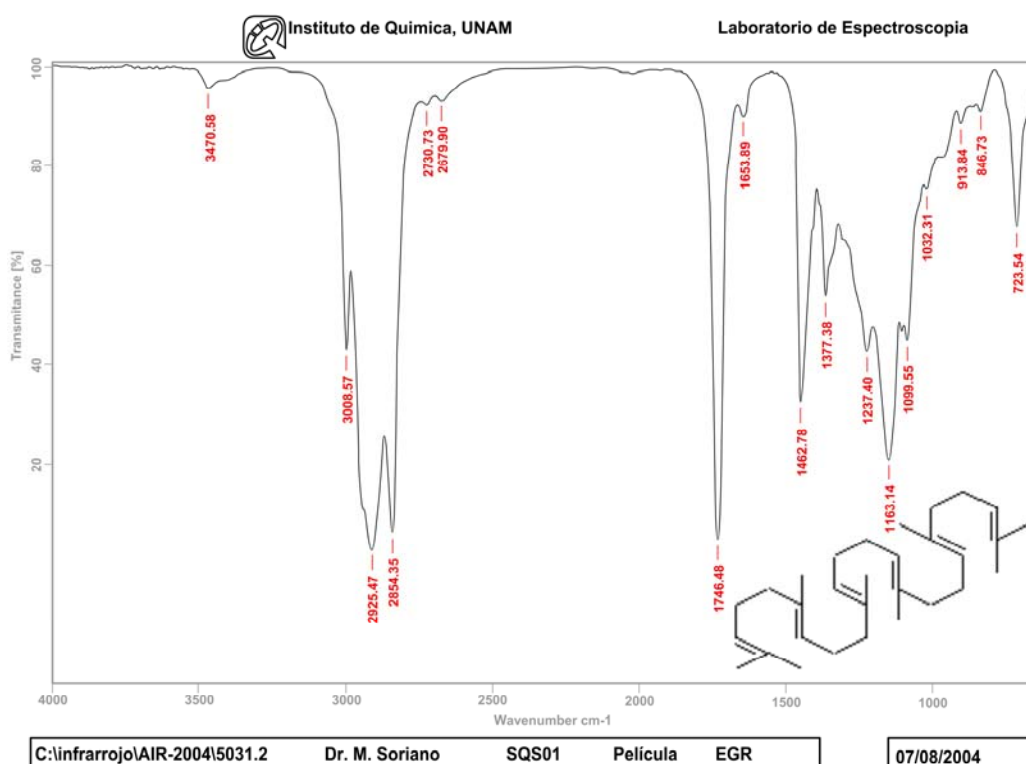


Figura 9.2 Espectro de IR del aceite crudo extraído de *Amaranthus hypochondriacus*.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro de IR del escualeno vegetal extraído y purificado de *Amaranthus hypochondriacus* es mostrado en la figura 9.3 en donde se muestran tres bandas principales  $2966.4\text{ cm}^{-1}$ ,  $2919.18\text{ cm}^{-1}$  y  $2854.2\text{ cm}^{-1}$  que son corresponden a enlaces C-H, en  $1668.1\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que representa los enlaces C=C y la contribución de los enlaces C-C se encuentra en los  $1223.1\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro es evidente la huella digital del escualeno al igual que en el espectro del estándar.

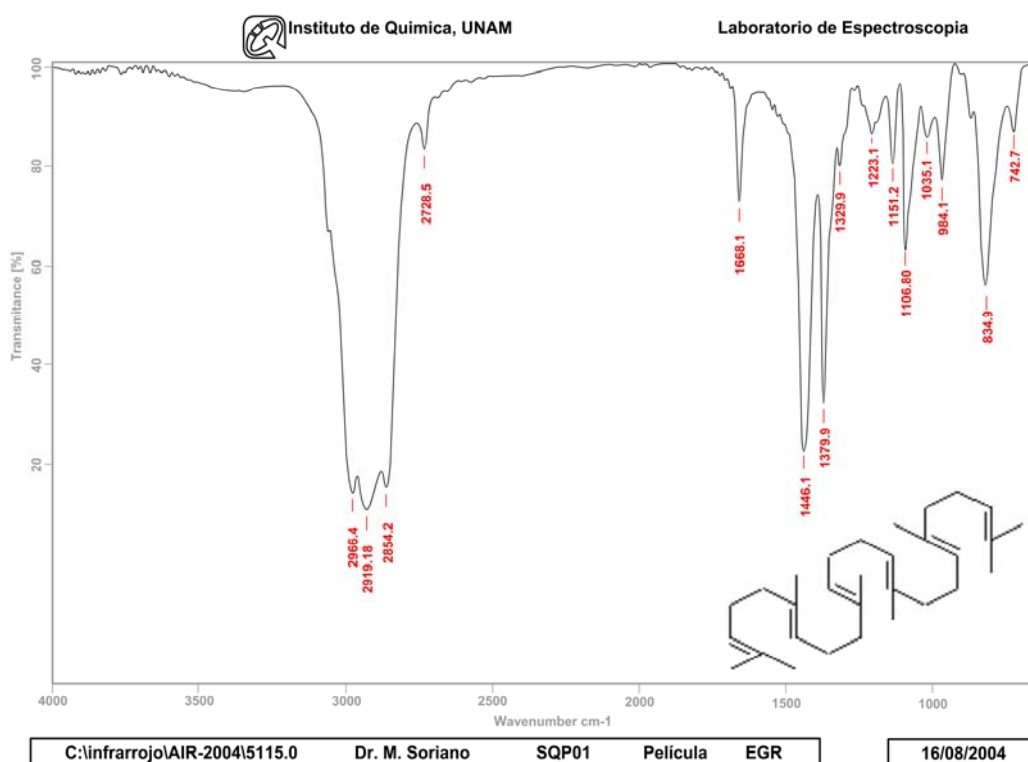


Figura 9.3 Espectro de IR del escualeno extraído y purificado de *Amarantus hypochondriacus*.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 9.1.2.2 Espectroscopia de masas (EM)

En la figura 9.4 se muestra el espectro de EM realizado a un estándar de escualeno (obtenido en SIGMA chemical, USA) en el cual se observa un pico base a 69 el cual corresponde a la fracción con mayor presencia la cual consta de 5 carbonos y 9 hidrógenos, también es observado un pico padre a los 410 que es el peso molecular de el escualeno.

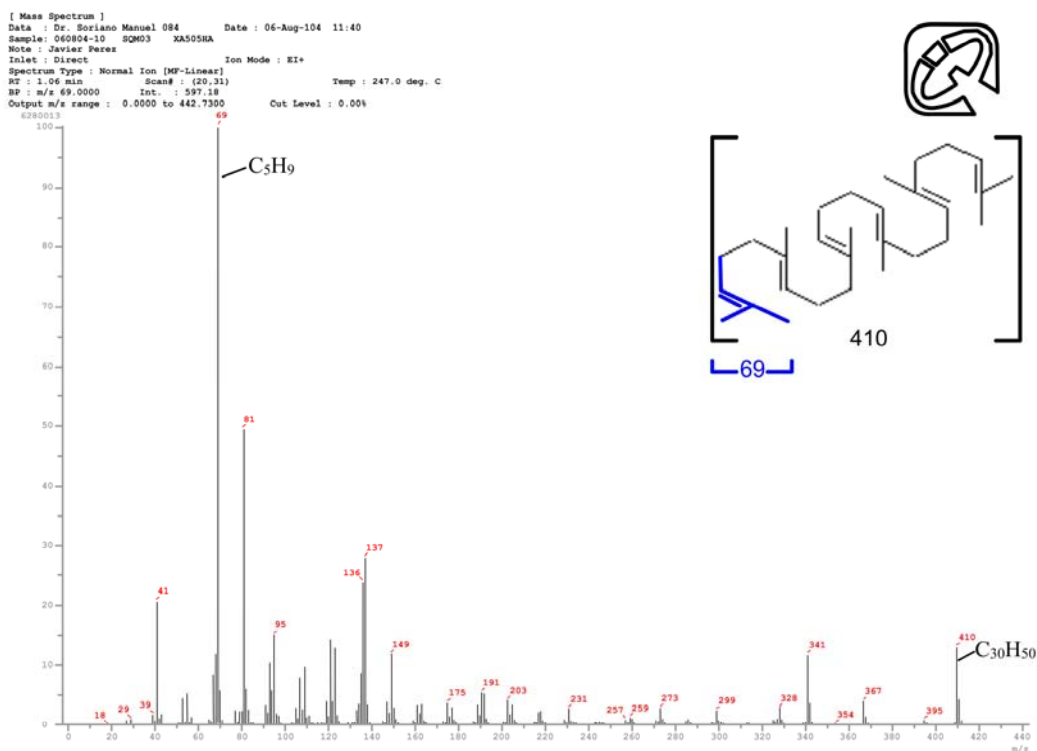


Figura 9.4 Espectro de masas del estándar de escualeno (SIGMA).



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro que se muestra en la figura 9.5 se observa un pico base a 69 el cual corresponde a la fracción con mayor presencia en la celda, la cual consta de 5 carbonos y 9 hidrógenos, también es observado un pico padre a los 410 que es el peso molecular de nuestra molécula.

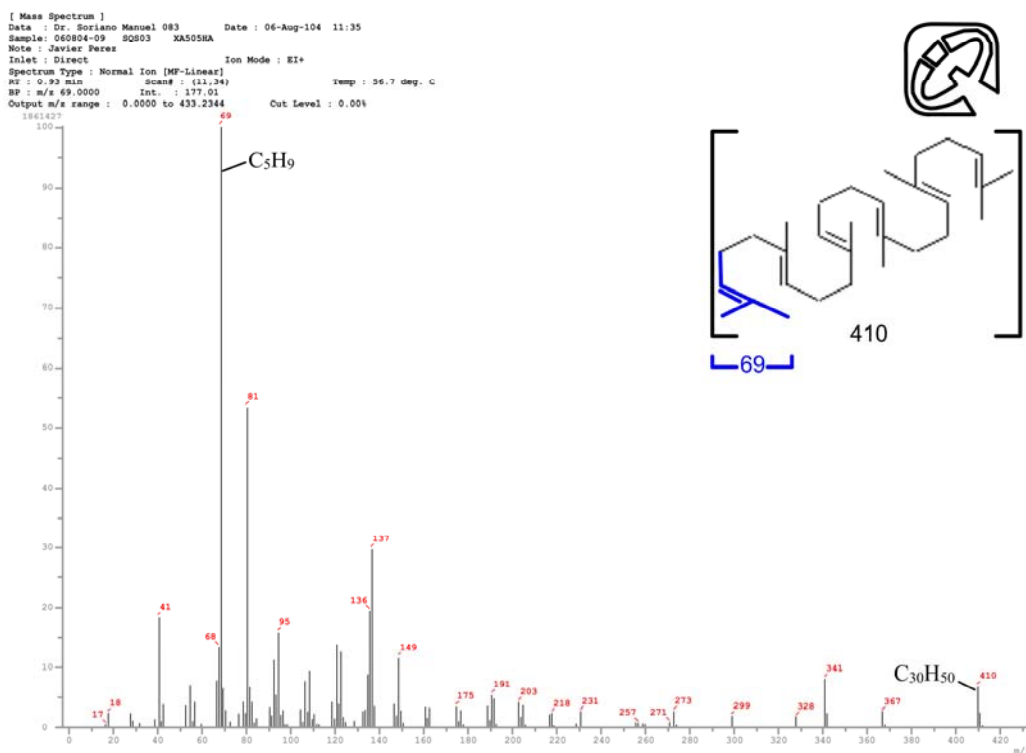


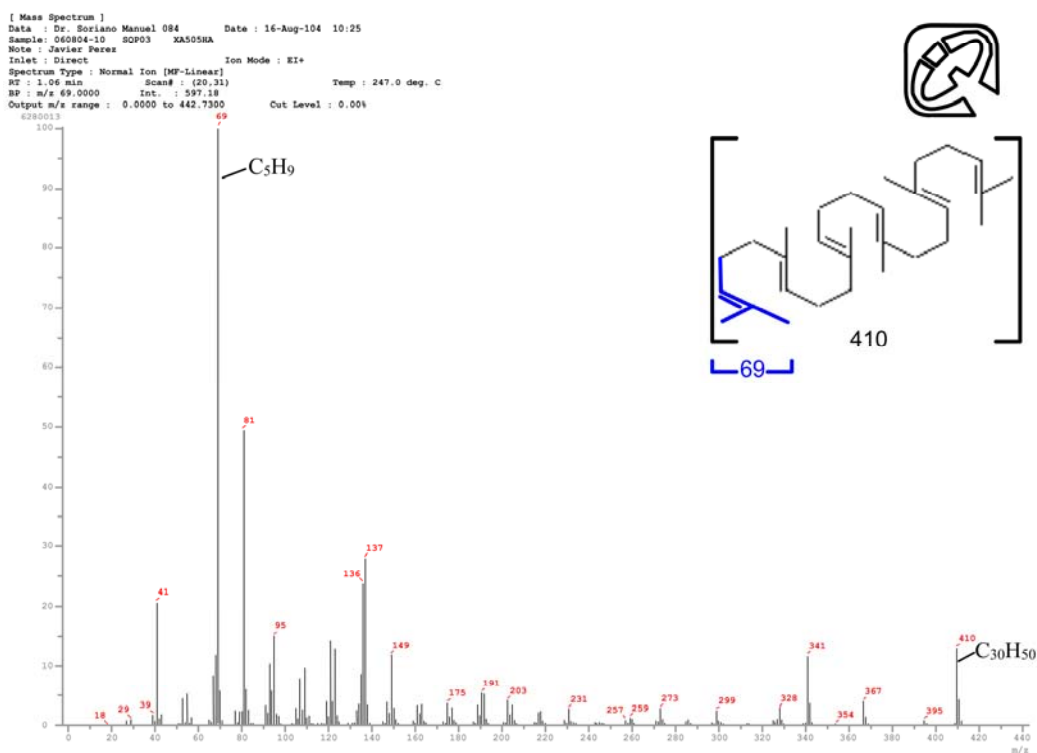
Figura 9.5 Espectro de masas del aceite crudo extraído de *Amaranthus hypochondriacus*.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 9.6 se observa el espectro de masas obtenido del escualeno vegetal extraído de *Amaranthus hypochondriacus* en el cual presenta un pico base a 69 el cual corresponde a la fracción con mayor presencia en la celda, la cual consta de 5 carbonos y 9 hidrógenos, también un pico padre a los 410 que es el peso molecular de la molécula de escualeno.



**Figura 9.6** Espectro de masas del escualeno extraído y purificado de *Amarantus hypochondriacus*.





### 9.1.2.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H)

En la figura 9.7 se muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300Mhz, CDCl<sub>3</sub>) del estándar de escualeno (obtenido en SIGMA chemical, USA) en el cual se aprecian los grupos CH<sub>3</sub> a  $\delta$  1.59 (s, 18H) y a  $\delta$  1.67 (s, 6H), CH<sub>2</sub> a  $\delta$  1.99-2.12 (m, 20H) y CH a  $\delta$  5.07-5.17 (m, 6H). Los espectros de NMR fueron comparados con los publicados en la literatura obteniéndose similitud entre ellos.

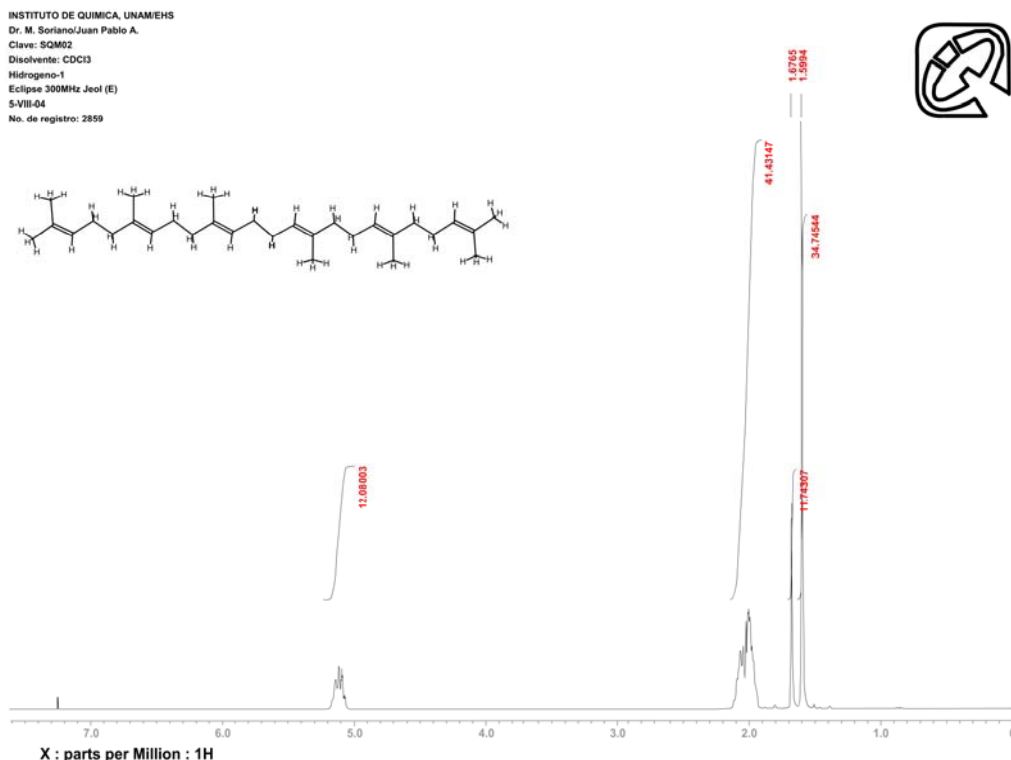


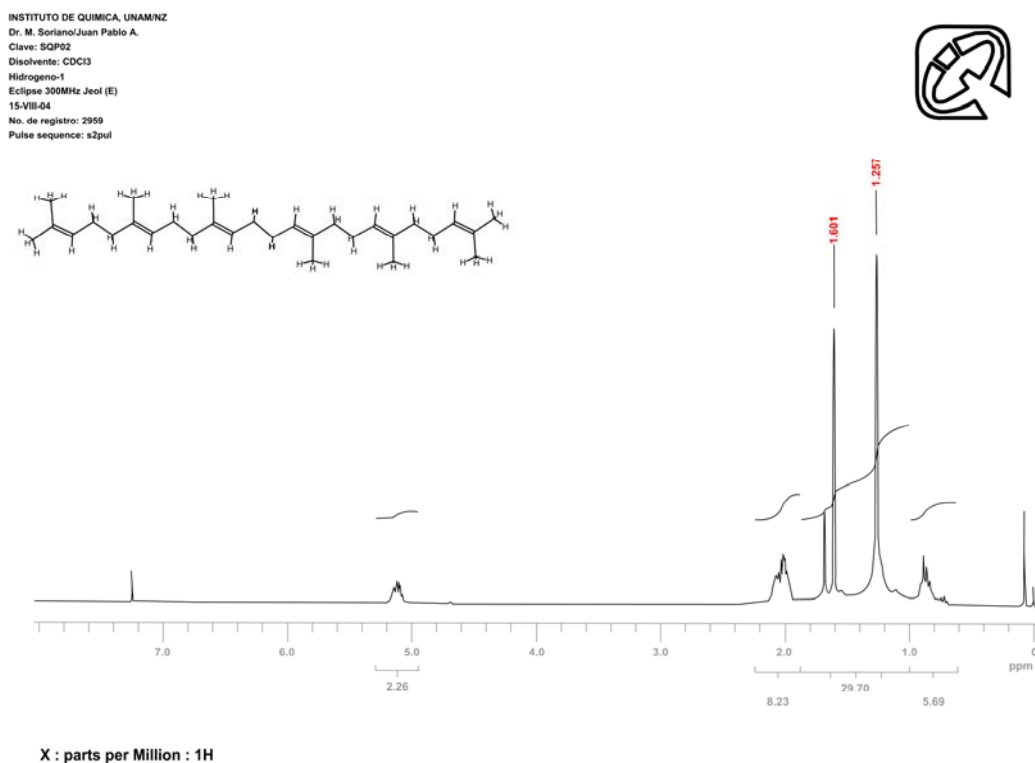
Figura 9.7 Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del estándar de escualeno (SIGMA).



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 9.8 se muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) del escualeno extraído y purificado de *Amaranthus hypochondriacus*, en el cual se observan a  $\delta$  1.6 (s, 18H) y a  $\delta$  1.68 (s, 6H) pertenecientes al grupo CH<sub>3</sub>, a  $\delta$  1.93-2.15 (m, 20H) los del grupo CH<sub>2</sub> y los del grupo CH se observan a  $\delta$  5.08-5.19 (m, 6H). En este espectro se aprecian también señales a  $\delta$  0.93 mostrando pequeñas impurezas evidenciando que el escualeno no está totalmente puro.



**Figura 9.8** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del escualeno extraído y purificado de *Amarantus hypochondriacus*.



### 9.1.2.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C)

En la figura 9.9 puede observarse el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (300Mhz, CDCl<sub>3</sub>) del estándar de escualeno (obtenido en SIGMA chemical, USA) seis carbonos de metilo a  $\delta$  15.9715-17.6434, dos mas a  $\delta$  25.6670, diez carbonos de metileno a d 26.6595-39.7370 y doce carbonos con doble enlace a  $\delta$  124.2867-135.0434. Los espectros de NMR fueron comparados con los publicados en la literatura obteniéndose similitud entre ellos.

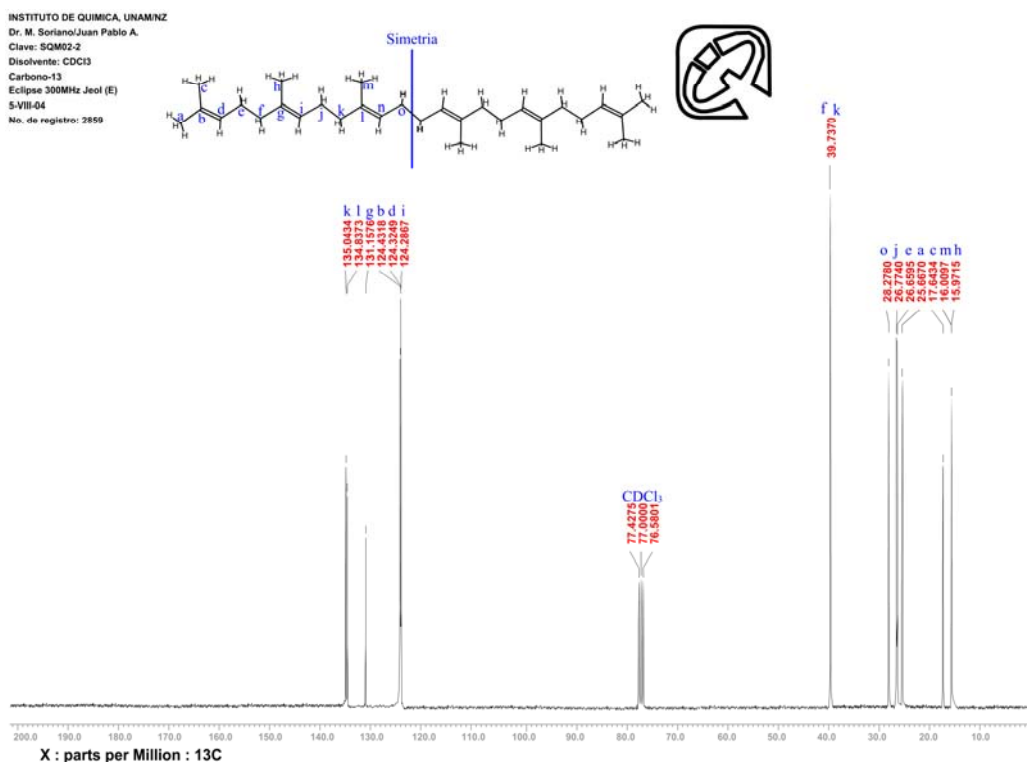


Figura 9.9 Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del estándar de escualeno (SIGMA).



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (300Mhz, CDCl<sub>3</sub>) del escualeno vegetal extraído y purificado de *Amaranthus hypochondriacus* es mostrado en la figura 9.10 en donde pueden observarse seis carbonos de metilo a  $\delta$  15.900-22.500, dos mas a  $\delta$  26.000, diez carbonos de metileno a d 26.50-39.762 y doce carbonos con doble enlace a  $\delta$  124.303-135.099. En este espectro también se ven pequeñas señales de poca intensidad que muestra todavía algunas impurezas en el escualeno.

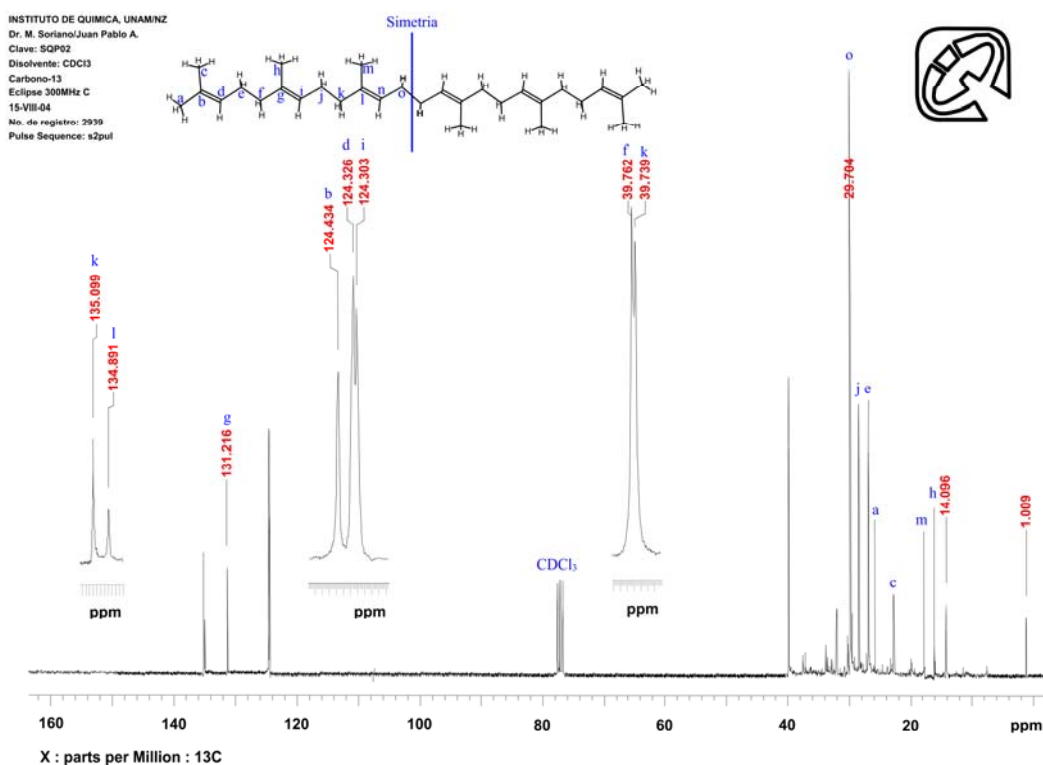
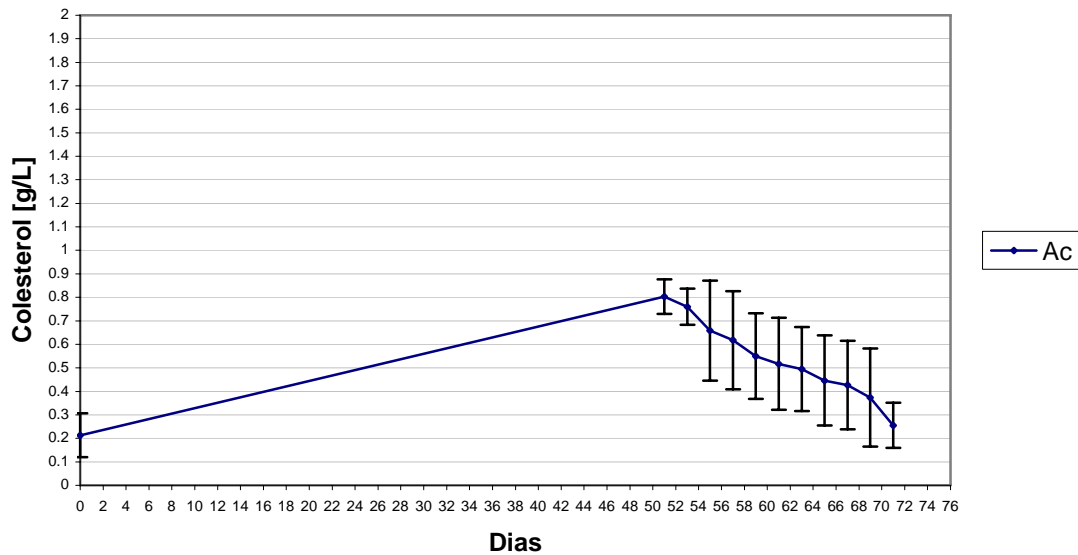


Figura 9.10 Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del escualeno extraído y purificado de *Amarantus hypochondriacus*.



### 9.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS

No fueron obtenidas diferencias significativas en las concentraciones sanguíneas en los triglicéridos, por ello los resultados del estudio son enfocados únicamente a las concentraciones de colesterol sanguíneo.



\* VALORES DE REFERENCIA EN CONEJOS 10-80mg/dL o 0.10-0.80 g/L (medirabbit)

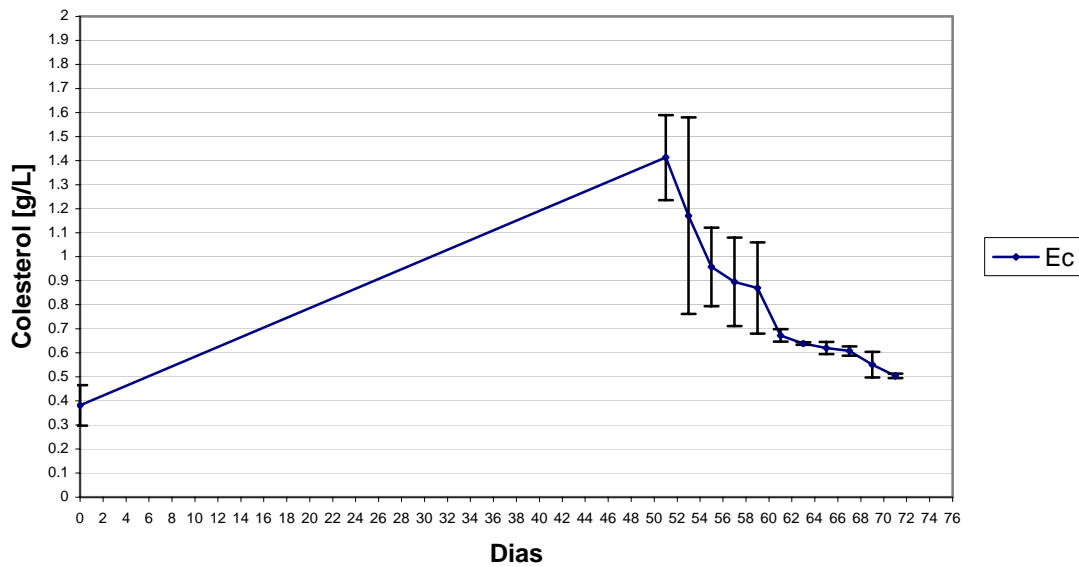
**Figura 9.11** Representación grafica del efecto presentado en el grupo D por la ingesta del aceite crudo extraído de *Amaranthus hypochondriacus* sobre las concentraciones del colesterol sanguíneo.

En la figura 9.11 se observa una representación gráfica, primero durante los primeros 51 días la inducción de la hipercolesterolemia por la ingesta de caseína, y segundo a partir del día 52 hasta el 72 es evidente el efecto reductor que presento la ingesta del aceite extraído de *Amaranthus hypochondriacus* en las concentraciones de colesterol sanguíneo.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN



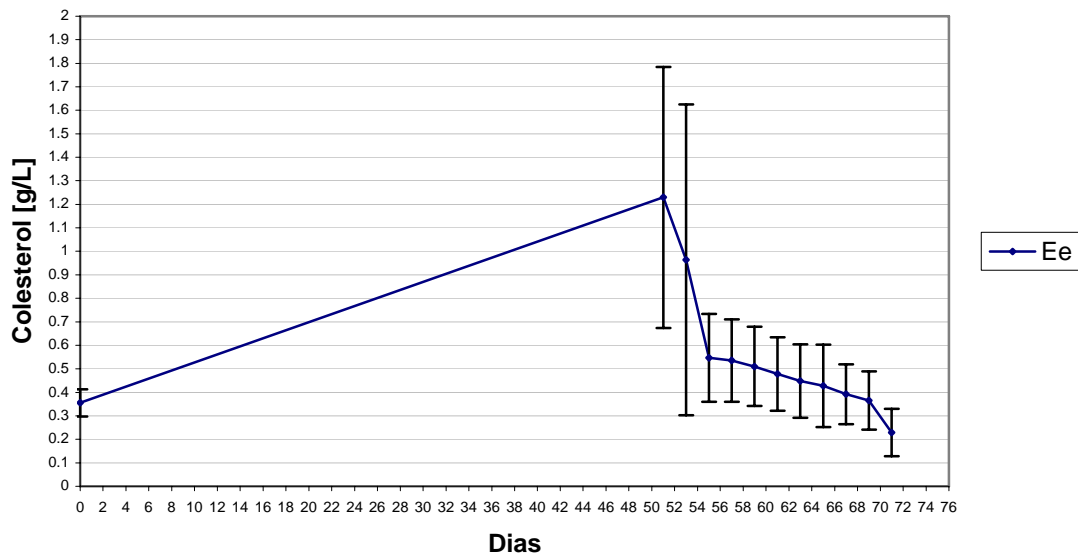
**Figura 9.12** Representación grafica del efecto presentado en el grupo B por la ingesta del estándar de escualeno (SIGMA®) sobre las concentraciones del colesterol sanguíneo.

En la figura 9.12 se observa una gráfica que representa, la inducción de la hipercolesterolemia por la ingesta de caseína durante los primeros 51 días, y segundo el efecto reductor que presento la ingesta del escualeno comercial (SIGMA) en las concentraciones de colesterol sanguíneo en los 21 días restantes.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN



\* VALORES NORMALES EN CONEJOS 10-80mg/dL o 0.10-0.80 g/L (medirabbit)

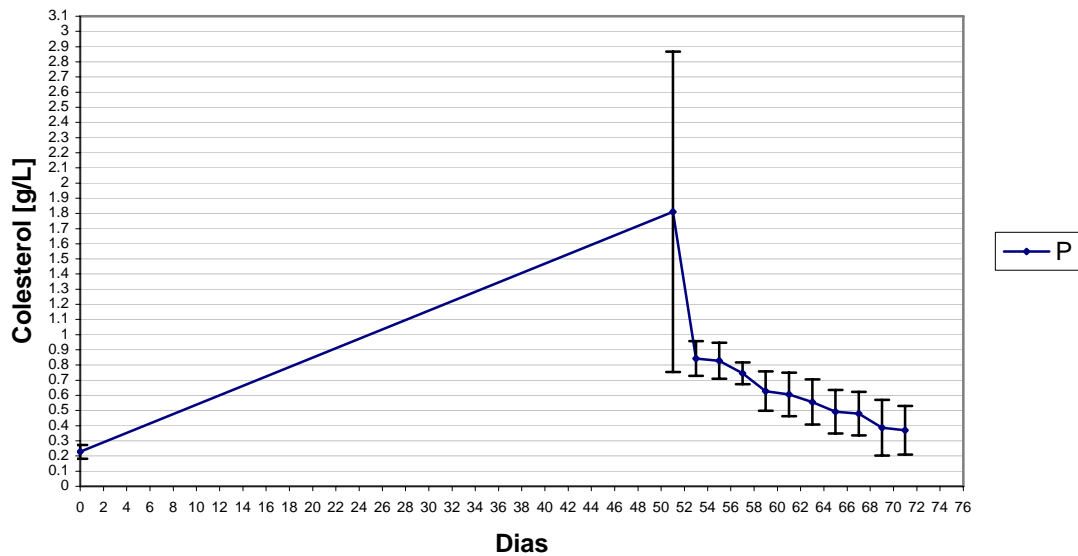
**Figura 9.13** Representación grafica del efecto presentado en el grupo A por la ingesta del escualeno extraído y purificado de *Amaranthus hypochondriacus* sobre las concentraciones del colesterol sanguíneo.

En la figura 9.13 se encuentra la gráfica que muestra la inducción de la hipercolesterolemia por la ingesta de caseína, y el efecto reductor que se presento durante la ingesta del escualeno vegetal extraído y purificado de *Amaranthus hypochondriacus* en las concentraciones de colesterol sanguíneo.



## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN



\* VALORES NORMALES EN CONEJOS 10-80mg/dL o 0.10-0.80 g/L (medirabbit)

**Figura 9.14** Representación grafica del efecto presentado en el grupo C por la ingesta de la pravastatina sobre las concentraciones del colesterol sanguíneo.

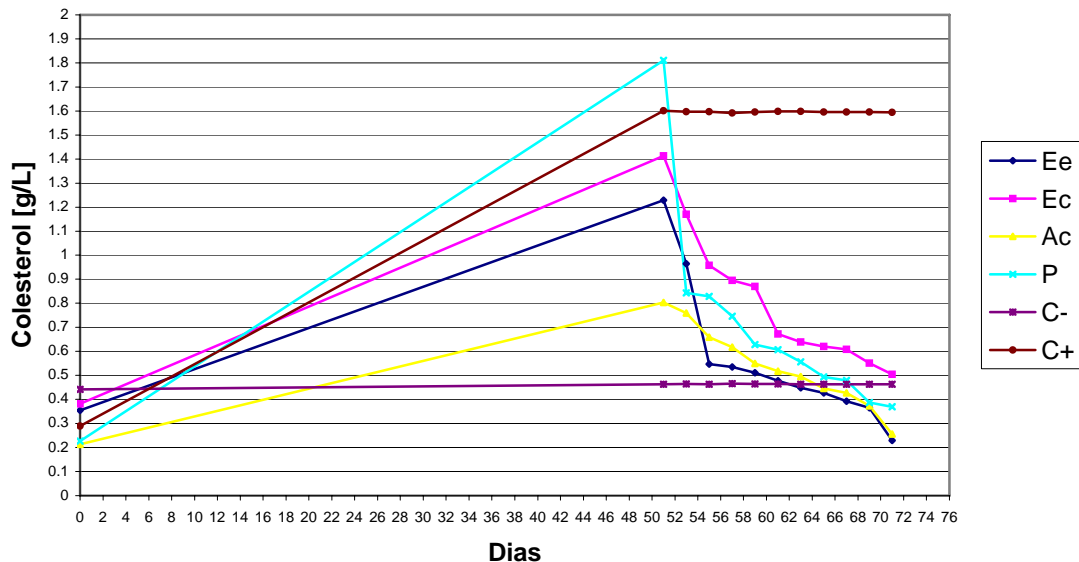
En la figura 9.14 se observa una representación gráfica de la inducción de la hipercolesterolemia por la ingesta de caseína durante 51 días y el efecto en la reducción del colesterol sanguíneo que se presentó por la ingesta de la pravastatina (KENDRICK).





## EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Ac = Aceite crudo C- = Control negativo C+ = Control positivo Ec = Escualeno comercial (SIGMA)  
Ee = Escualeno extraído de *Amaranthus hypochondriacus* P = Pravastatina  
\* VALORES NORMALES EN CONEJOS 10-80mg/dL o 0.10-0.80 g/L (medirabbit)

Figura 9.15 Representación grafica del efecto presentado por los diversos tratamientos sobre las concentraciones del colesterol sanguíneo.

Para evaluar el efecto que se producía en los conejos Nueva Zelanda al implementarles en la dieta los tratamientos con aceite crudo de amaranto, escualeno extraído de las semillas de amaranto y escualeno comercial (SIGMA®), se les dio seguimiento a las concentraciones de colesterol (figura 9.15) y triglicéridos en sangre, obteniéndose como resultados reducción en el colesterol de un **81.34%** con el escualeno vegetal (*Amaranthus hypochondriacus*), **64.26%** con el escualeno comercial (SIGMA) y en un **68.19%** con el aceite crudo extraído del amaranto comparándose con un **79.61%** de reducción causado por la pravastatina (KENDRICK).

Es evidente que la mayor reducción fue producida por el escualeno vegetal, entonces se podría decir que la presencia de residuos como los  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocoferoles y tocotrienoles<sup>65</sup> que se sabe también actúan en la reducción del colesterol incrementa esta a comparación del escualeno comercial (SIGMA), que se cree con mayor pureza por los resultados mostrados en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



## 10. CONCLUSIONES

El estudio del extracto de *Amaranthus hypochondriacus* permitió el aislamiento y la caracterización del escualeno, un compuesto de gran interés para diferentes tipos de industrias cosméticas y de alimentos.

La metodología empleada permitió obtener tanto el escualeno purificado como el aceite de insaponificables de amaranto que se sabe en el se contienen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocoferoles y tocotrienoles<sup>65</sup> y que se caracterizan por reducir el colesterol sanguíneo.<sup>41</sup>

El método empleado permite el escalamiento para su extracción a nivel piloto e industrial.

Los resultados farmacológicamente sustentan que el escualeno vegetal tiene la propiedad de disminuir el colesterol sanguíneo.

Colateralmente sugieren que la reducción del colesterol sanguíneo causada por la ingesta de amaranto es debida al escualeno y a otros compuestos presentes en el aceite insaponificable del *Amaranthus hypochondriacus* por ejemplo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocoferoles y tocotrienoles.<sup>65</sup>

Con el estudio de los efectos terapéuticos asociados a compuestos contenidos en las plantas que actualmente son cultivadas en México, pueden ser de importancia económica tanto para las industrias como para los agricultores además de explotar los recursos naturales con los que cuenta el país.



## 11. RECOMENDACIONES Y EXPECTATIVAS

- Probar el método de extracción de escualeno a nivel piloto y posteriormente a nivel industrial.
- Realizar estudios farmacológicos para determinar la dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>).
- Realizar ensayos biológicos del aceite insaponificable del amaranto ya que se cree que la presencia de otros compuestos insaponificables favorecerán la reducción del colesterol sanguíneo.



**EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL SANGUÍNEO POR EFECTO DE LA INGESTA DE ESCUALENO VEGETAL (*Amaranthus hypochondriacus*) EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS.**

**RECOMENDACIONES Y EXPECTATIVAS**

**ABREVIATURAS**

<b>ACV</b>	Accidentes cerebrovasculares
<b>ADP</b>	Adenosina-5'-difosfato.
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato.
<b>CCF</b>	Cromatografía de capa fina.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CoA</b>	Coenzima A.
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis efectiva media
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media
<b>EC</b>	Enfermedades coronarias.
<b>EM</b>	Espectroscopia de masas
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad.
<b>HF</b>	Hipercolesterolemia familiar
<b>HMG CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.
<b>INEGI</b>	Instituto nacional de estadística geografía e informática
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad.
<b>Max</b>	Máximo
<b>NADP+</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina 2'-fosfato.
<b>NADPH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina 2'-fosfato en su forma reducida.
<b>NMX</b>	Norma mexicana
<b>NOM</b>	Norma oficial mexicana
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PPi</b>	Pirofosfato inorgánico.
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear protónica
<b>SSA</b>	Secretaría de salud
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad.

## 12. REFERENCIAS

- 01 Andrés S. Fleitas Estévez Y Dr. Rafael Simón Carballo; **“EFECTO DE LA COLESTINA SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL EN CONEJOS”**; *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 2002;3(2):18-23.
- 02 Asaf A. Qureshi, James W. Lehmann & David M. Peterson; **“AMARANTH AND ITS OIL INHIBIT CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS IN 6-WEEK-OLD FEMALE CHICKENS”**; *The Journal of Nutrition*; 1996;126 (8):1972-1978.
- 03 Chan P, Tomlinson B, Lee CB, Lee YS.; **“EFFECTIVENESS AND SAFETY OF LOW-DOSE PRAVASTATIN AND SQUALENE, ALONE AND IN COMBINATION, IN ELDERLY PATIENTS WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA”**; *Journal of Clinical Pharmacology*; 1996;36:422-427.
- 04 Donald Smith, Antonio Espino-Montoro, Francisco Perez-Jimenez, Juan Pedro-Botet, Jose Jimenez Pereperez, Jose M. Ordovas; **“EFFECT OF A HIGH SATURATED FAT AND CHOLESTEROL DIET SUPPLEMENTED WITH SQUALENE OR  $\beta$ -SITOSTEROL ON LIPOPROTEIN PROFILE IN F1B HAMSTERS”**; *Nutrition Research*; 2000;20(9):1309-1318.
- 05 Dr. Bernadette Delplanque; Chargée de Recherches INSERM; Metabolisme des Lipoprotéines Laboratoire de Physiologie de la Nutrition; Centre de Recherche d’Orsay; Université Paris Sud Prof. Dr. Marcelo Tavella; Investigador Independiente CONICET; PROPIACIC-UNLP; Facultad de Ciencias Médicas. UNLP Bioq. Graciela Peterson; PROPIA-CIC-UNLP; Facultad de Ciencias Médicas. UNLP; **“EL ACEITE DE GIRASOL DE ALTO OLEICO Y LA PREVENCIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS”**; Convenio DowAgroSciences Argentina y UNLP (PROPIA) pg. 1-16.
- 06 Dra. Maria Esther Salgueiro Meneses Dra. Gilka Rocha Mercado; **“HIPERCOLESTEROLEMIA”**; *Rev Bol Med Fam*; 2003;2(3):27-32
- 07 E. Ros, D. Zambon, R. Tresserras, C. Brotons Y C. Castell; **“CRIBADO DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA”**; *Med Clin (Barc)*; 1994;102(1):68-74.

- 08 Esther Van Praag; **“PHLEBOTOMY (BLOOD DRAWING) OF THE RABBIT”**;  
*Blood Biochemesty of Rabbits*, <http://www.medirabbit.com>, 2003;1-5.
- 09 Farid Benayoud, Ahmed Abouabdellah, Cyrille Richard, Danièle Le Bonnet-Delpon,  
Jean-Pierre Bégué, Danielle Levasseur, Olivier Boutaud And Francis Schuber;  
**“TRIFLUOROMETHYL KETONES DERIVED FROM SQUALENE:  
INHIBITION OF THE CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS IN HEPG2  
CELLS”**; *Tetrahedron Letters*; 2000;41:6367-6370.
- 10 Gregory S. Kelly, N.D.; **“SQUALENE AND ITS POTENTIAL CLINICAL USES”**;  
*Altern Med Rev*; 1999;4(1):29-36.
- 11 Gylling H, Miettinen TA.; **“POSTABSORPTIVE METABOLISM OF DIETARY  
SQUALENE”**; *Atherosclerosis*; 1994;106:169-178.
- 12 H.T. Khor & D.Y. Chieng, Msc.; **“EFFECT OF SQUALENE, TOCOTRIENOLS  
AND  $\alpha$ -TOCOPHEROL SUQPLEMENTATIONS IN THE DIET ON  
SERUM LIVER LIPIDS IN THE HAMSTER”**; *Nutrition Research*;  
1997;17(3):475-483.
- 13 Han-Ping He & Harold Corke; **“OIL AND SQUALENE IN AMARANTHUS  
GRAIN AND LEAF”**; *J. Agric. Food Chem.*; 2003;51:7913-7920.
- 14 Harold L. Newmark; **“SQUALENE, OLIVE OIL, AND CANCER RISK”**; *Strang  
Cancer Research Laboratory at The Rockefeller University, New York, New  
York 10021, USA and Rutgers University, Laboratory for Cancer Research,  
Piscataway, New Jersey 08854-8020, USA*.
- 15 He, H.-P.; Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H.; **“EXTRACTION AND PURIFICATION OF  
SQUALENE FROM AMARANTHUS GRAIN”**; *Journal of Agricultural and  
Food Chemistry*; 2002;50:368-372.
- 16 Heikki Relas; **“METABOLISM OF SQUALENE IN TRIGLYCERIDE-RICH  
LIPOPROTEINS IN HUMANS”**; *Department of Medicine University of  
Helsinki, Helsinki, Finland*, 2001.
- 17 Ikuro Abe, Takahiro Seki, Kaoru Umehara, Toshio Miyase, Hiroshi Noguchi, Jun  
Sakakibara, And Teruo Ono; **“GREEN TEA POLYPHENOLS: NOVEL  
AND POTENT INHIBITORS OF SQUALENE EPOXIDASE”**;  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*; 2000;268:767-771.

- 18 J.L. Guil-Guerrero, F. García-Maroto, P. Campra-Madrid, F. Gómez-Mercado; **“OCCURRENCE AND CHARACTERIZATION OF OILS RICH IN  $\gamma$ -LINOLENIC ACID PART II: FATTY ACIDS AND SQUALENE FROM *Macaronesian echium* LEAVES”**; *Phytochemistry*; 2000;54:525-529.
- 19 John M. Taylor<sup>1</sup> & Jianglin Fan; **“TRANSGENIC RABBIT MODELS FOR THE STUDY OF ATHEROSCLEROSIS”**; *Frontiers in Bioscience* 2; 1997;298-308.
- 20 John R. Crouse III; Timothy Morgan; James G. Terry; Julie Ellis; Mara Vitolins; Gregory L. Burke; **“A RANDOMIZED TRIAL COMPARING THE EFFECT OF CASEIN WITH THAT OF SOY PROTEIN CONTAINING VARYING AMOUNTS OF ISOFLAVONES ON PLASMA CONCENTRATIONS OF LIPIDS AND LIPOPROTEINS”**; *Arch Intern Med.*; 1999;159(27):2070-2076.
- 21 Jonathan P. Taylor; **“THE SELECTIVE EXTRACTION OF SQUALENE FROM THE OTHER COMPONENTS OF DEEP-SEA SHARK LIVER OILS USING;(A) THE CRYSTALLISATION OF UREA COMPLEXES,(B) LIQUID-LIQUID SOLVENT EXTRACTION”**; Tesis licenciatura IQ, 4/40 York St Indooroopilly QLD 4068 19th October 1998.
- 22 LEE Jong-wook; **“THE WORLD HEALTH REPORT 2003”**; *WORLD HEALTH ORGANIZATION*; 2004.
- 23 Lorna Goshman; **“PERSPECTIVE ON CHOLESTEROL LOWERING AGENTS: ATORVASTATIN”**; *Journal of the Pharmacy Society of Wisconsin*; 1998;28-34.
- 24 Masae Sawada, Masahiko Matsuo, Hiroyuki Hagihara, Noriko Tenda, Akira Nagayoshi, Hiroyuki Okumura, Ken-Ichi Washizuka, Jiro Seki, Toshio Goto; **“EFFECT OF FR194738, A POTENT INHIBITOR OF SQUALENE EPOXIDASE, ON CHOLESTEROL METABOLISM IN HepG2 CELLS”**; *European Journal of Pharmacology*; 2001;431:11-16.
- 25 Massimo F. Marcone; **“STARCH PROPERTIES OF *Amaranthus pumilus* (SEABEACH AMARANTH): A THREATENED PLANT SPECIES WITH POTENTIAL BENEFITS FOR THE BREEDING/ AMELIORATION OF PRESENT *Amaranthus cultivars*”**; *Food Chemistry*; 2001;73:61-66.

- 26 Miettinen TA, Vanhanen H.; **“SERUM CONCENTRATION AND METABOLISM OF CHOLESTEROL DURING RAPESEED OIL AND SQUALENE FEEDING”**; *American Journal of Clinical Nutrition*; 1994;59:356-63.
- 27 Miettinen, T.A.; **“DIURNAL VARIATION OF CHOLESTEROL PRECURSOR’S SQUALENE AND METHYL STEROLS IN HUMAN PLASMA LIPOPROTEINS”**; *Journal of Lipid Research*; 1982;23:466–473.
- 28 Newmark HL; **“SQUALENE, OLIVE OIL, AND CANCER RISK: A REVIEW AND HYPOTHESIS”**; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 1997;6:1101-1103.
- 29 Nina Škottová, Vladimír Krečman, Daniela Walterová, Jitka Ulrichová, Pavel Kosina, Vilim Šimánek; **“EFFECT OF SILYMARIN ON SERUM CHOLESTEROL LEVELS IN RATS”**; *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.*; 1998;141:87-89.
- 30 NORMA MEXICANA, NMX-F-074-S-1981 Alimentos para humanos, Aceites esenciales, aceites y grasas vegetales o animales; **“DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN CON EL REFRACTÓMETRO DE ABBE”**.
- 31 NORMA MEXICANA, NMX-F-101-1987, Alimentos-aceites y grasas vegetales o animales; **“DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ”**.
- 32 NORMA MEXICANA, NMX-F-174-S-1981, Alimentos para humanos, aceites y grasas vegetales o animales; **“DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN”**.
- 33 NORMA MEXICANA, NMX-F-408-1981, Alimentos-aceites y grasas vegetales o animales; **“DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO POR EL MÉTODO DE HANUS”**.
- 34 NORMA MEXICANA, NMX-F-75-1987, Alimentos aceites y grasas vegetales o animales; **“DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA”**.
- 35 Oliver P. Flint, Barbara A. Masters, Richard E. Gregg, And Stephen K. Durham; **“INHIBITION OF CHOLESTEROL SYNTHESIS BY SQUALENE SYNTHASE INHIBITORS DOES NOT INDUCE MYOTOXICITY *In Vitro*”**; *Toxicology And Applied Pharmacology*; 1997;145:91–98.



- 36 Oregon Health Resources Commission; **“HMG-COA REDUCTASE INHIBITORS (STATINS)”**; Report page 2 Update #1; 2003.
- 37 P. Virk, P.K. Saxena; **“POTENTIAL OF *Amaranthus* SEEDS IN SUPPLEMENTARY FEED AND ITS IMPACT ON GROWTH IN SOME CARPS”**; *Bioresource Technology*; 2003;86:25–27.
- 38 Peter H. Langsjoen; F.A.C.C.; **“THE CLINICAL USE OF HMG COA-REDUCTASE INHIBITORS (STATINS) AND THE ASSOCIATED DEPLETION OF THE ESSENTIAL CO-FACTOR COENZYME Q10; A REVIEW OF PERTINENT HUMAN AND ANIMAL DATA”**; *Cardiovascular Diseases Research in Biomedical Aspects of Coenzyme Q10*, USA, <http://www.wcsi.unian.it/coenzymeQ>.
- 39 Plate, A.Y.A & Aréas, J.A.G.; **“CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT OF EXTRUDED AMARANTH (*Amaranthus caudatus* L.) IN HYPERCHOLESTEROLEMIC RABBITS”**; *Food Chemistry*; 2002;76(1):1-6.
- 40 Poustie VJ, Rutherford P.; **“TRATAMIENTO CON DIETA PARA LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR”**; (Revisión Cochrane traducida). En: *La Cochrane Library plus en español*, Oxford, Update Software Ltd. 2004.
- 41 Radhakrishnan A. Rajaratnam, Helena Gylling & Tatu A. Miettinen; **“IMPAIRED POSTPRANDIAL CLEARANCE OF SQUALENE AND APOLIPOPROTEIN B-48 IN POST-MENOPAUSAL WOMEN WITH CORONARY ARTERY DISEASE”**; *Clinical Science*; 1999;97:183–192.
- 42 Radhakrishnan Rajaratnam; **“IMPACT OF SERUM SQUALENE, POSTPRANDIAL LIPOPROTEINS, AND CHOLESTEROL METABOLISM ON CORONARY ARTERY DISEASE IN POSTMENOPAUSAL WOMEN”**; *University of Helsinki, for public examination in the Auditorium of the Department of Oncology, University Central Hospital of Helsinki, Haartmaninkatu 4, Helsinki on December 8th, 2000*.
- 43 Rajaratnam, R.; **“IMPACT OF SERUM SQUALENE, POSTPRANDIAL LIPOPROTEINS, AND CHOLESTEROL METABOLISM ON CORONARY ARTERY DISEASE IN POSTMENOPAUSAL WOMEN”**; *PhD Thesis, University of Helsinki. 2000*.

- 44 Rantala, Maire; **“DIETARY MODIFICATION AND GENETIC VARIABILITY OF ATHEROSCLEROSIS RISK FACTORS”**; *Department of Internal Medicine and Biocenter Oulu, University of Oulu, FIN 90220 Oulu, Finland* 2000.
- 45 Reijo Tilvis, Petri T. Kovanen, & Tatu A. Miettinen; **“METABOLISM OF SQUALENE IN HUMAN FAT CELLS”**; *The Journal Of Biological Chemistry*; 1982;257(17):10300-10305.
- 46 Salgueiro Meneses Maria Esther, Rocha Mercado Gilka; **“HIPERCOLESTEROLEMIA”**; *Rev Bol Med Fam*; 2003;2(3):27-32.
- 47 Secretaría de Salud, Subsecretaría de Innovación y Calidad, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño; **“ANUARIO ESTADÍSTICO SECRETARÍA DE SALUD 2002”**; S.S.A.; 2003; <http://www.salud.com.mx>
- 48 Serena Tonstad, Knut Smerud, & Lars Hoie; **“A COMPARISON OF THE EFFECTS OF 2 DOSES OF SOY PROTEIN OR CASEIN ON SERUM LIPIDS, SERUM LIPOPROTEINS, AND PLASMA TOTAL HOMOCYSTEINE IN HYPERCHOLESTEROLEMIC SUBJECTS”**; *Am J Clin Nutr.*; 2002;76:78-84.
- 49 Sílvia Coimbra & Roberto Salema; **“Amaranthus hypochondriacus: SEED STRUCTURE AND LOCALIZATION OF SEED RESERVES”**; *Annals of botany*; 1994;74:373-379.
- 50 Skottova N.; Krecman V. and Walterova D.; **“EFFECT OF SILYMARIN ON SERUM CHOLESTEROL LEVELS IN RATS”**; *Acta Univ. Palacki Olomuc*; 1989;141: 87-9.
- 51 Storm HM, Oh SY, Kimler BF, Norton S.; **“RADIOPROTECTION OF MICE BY DIETARY SQUALENE”**; *Lipids*; 1993;28:555-559.
- 52 Strandberg TE, Silvis RS and Miettinen TA.; **“METABOLIC VARIABLES OF CHOLESTEROL DURING SQUALENE FEEDING IN HUMANS: COMPARISON WITH CHOLESTYRAMINE TREATMENT”**; *Journal of Lipid Research*; 1990;31:1637-1643

- 53 Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA.; **“EFFECTS OF CHOLESTYRAMINE AND SQUALENE FEEDING ON HEPATIC AND SERUM PLANT STEROLS IN THE RAT”**; *Lipids*; 1989;24:705-708.
- 54 Sung-Ling Yeh; Chang-Yun Hsu, B.S., Ming-Jer Shieh; **“EFFECT OF DIETARY CASEIN AND SOY PROTEIN ON PLASMA LIPIDS IN A STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MODEL IN HAMSTERS”**; *Nutrition Research*; 1998;18(10)1757-1768.
- 55 Susan M. Maier, Nancy D. Turner, & Joanne R. Lupton; **“SERUM LIPIDS IN HYPERCHOLESTEROLEMIC MEN AND WOMEN CONSUMING OAT BRAN AND AMARANTH PRODUCTS”**; *Cereal Chem*; 77(3):297–302.
- 56 T. A. Miettinen; **“DIURNAL VARIATION OF CHOLESTEROL PRECURSORS SQUALENE AND METHYL STEROLS IN HUMAN PLASMA LIPOPROTEINS”**; *Journal of Lipid Research*; 1982;23:466-473.
- 57 T. E. Strandberg, R. S. Tilvis, & T. A. Miettinen; **“METABOLIC VARIABLES OF CHOLESTEROL DURING SQUALENE FEEDING IN HUMANS: COMPARISON WITH CHOLESTYRAMINE TREATMENT”**; *Journal of Lipid Research*; 1990;31:1637-1643.
- 58 T.H. Khoe en Lukas T.S. Tjan; **“THE ROLE OF SQUALENE IN HEALT”**; *Fahrenheit Farma Nutritions*; 2003.
- 59 T.H. Khoe en Lukas T.S. Tjan; **“VERBAND OMEGA VETZUREN EN CARCINOOM”**; *Fahrenheit Farma Nutritions*; 2003.
- 60 Tilvis R, Kovanen PT, Miettinen TA.; **“METABOLISM OF SQUALENE IN HUMAN FAT CELLS. DEMONSTRATION OF A TWO-POOL SYSTEM”**; *The Journal Of Biological Chemistry*; 1982;257:10300-10305.
- 61 Todd D. Porter; **“SUPERNATANT PROTEIN FACTOR AND TOCOPHEROL-ASSOCIATED PROTEIN: AN UNEXPECTED LINK BETWEEN CHOLESTEROL SYNTHESIS AND VITAMIN E (REVIEW)”**; *Journal of Nutritional Biochemistry*; 2003;14:3–6.
- 62 Viviana E. Cétola; **“COLESTAT ENZIMÁTICO MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CHOLESTEROL EN SUERO O PLASMA”**;

Wiener Laboratorios S.A.I.C. <http://www.wiener-lab.com.ar>, 2000 - Rosario – Argentina.

- 63 Viviana E. Cétola; **“TG COLOR GPO/PAP AA MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS EN SUERO O PLASMA”**; Wiener Laboratorios S.A.I.C. <http://www.wiener-lab.com.ar>, 2000 - Rosario – Argentina.
- 64 Yumiko Nakamura; Yasuhide Tonogai; Yukari Tsumura; Tadashi Shibata & Mitsuru Uchiyama; **“EFFECT OF DIETARY SQUALENE ON THE FECAL STEROID EXCRETIONS AND THE LIPID LEVELS OF SERUM AND THE LIVER IN THE RAT”**; *Nutrition Research*; 1997;17(2):243-2577.
- 65 A. Berger, I. Monnard, F. Dionisi, D. Gumy, K.C. Hayes, P. Lambelet; **“CHOLESTEROL-LOWERING PROPERTIES OF AMARANTH FLAKES, CRUDE AND REFINED OILS IN HAMSTERS”**; *Food Chemistry*; 2003;81:119–124.

## 13. ANEXOS

# ANEXO 1



## Colestat enzimático

Método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma

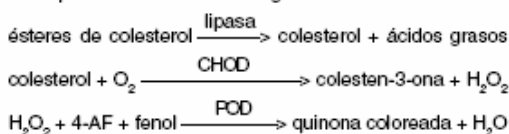
### SIGNIFICACION CLINICA

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada. Se ha visto que el colesterol es uno de los factores contribuyentes a la formación de ateromas dado que las complicaciones arterioscleróticas prevalecen en individuos hipercolesterolémicos.

Estudios epidemiológicos demuestran que el riesgo de contraer enfermedad cardíaca coronaria para individuos de más de 40 años con colesterolemia menor a 2,10 g/l es 3 veces menor que entre individuos con más de 2,30 g/l y 6 veces menor que entre individuos con más de 2,60 g/l.

### FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema reaccional es el siguiente:



### REACTIVOS PROVISTOS

**Standard:** solución de colesterol 2 g/l.

**Enzimas:** suspensión conteniendo lipasa fungal 300 U/ml, colesterol oxidasa (CHOD) 3 U/ml y peroxidasa (POD) 20 U/ml.

**Reactivo 4-AF:** solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l.

**Reactivo Fenol:** solución de fenol 55 mmol/l.

### Concentraciones finales

Lipasa .....	≥ 6000 U/l
CHOD .....	≥ 60 U/l
POD .....	≥ 400 U/l
4-AF .....	1,25 mmol/l
Fenol .....	2,75 mmol/l
pH .....	7,4 ± 0,1 (a t° amb.)

### REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

### INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Standard:** mezclar por inversión antes de usar.

**Enzimas:** homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

**Reactivo 4-AF:** listo para usar.

**Reactivo Fenol:** listo para usar. Ver PRECAUCIONES.

**Reactivo de Trabajo:** según el volumen de trabajo colocar en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de Reactivo 4-AF, 5 partes de Reactivo Fenol y llevar a 100 partes con agua destilada. Agregar 2 partes de Enzimas previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar. Pueden prepararse distintas cantidades respetando las pro-

porciones establecidas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de que el Reactivo Fenol no deteriore el Reactivo de Trabajo.

### PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". El fenol es tóxico e irritante.

### ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**Reactivos Provistos:** son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

**Reactivo de Trabajo:** en refrigerador y en frasco de vidrio color caramelo es estable 1 mes a partir del momento de su preparación.

### INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Durante el uso, el Reactivo de Trabajo puede desarrollar un ligero color rosado que no afecta los resultados siempre que se procese un Blanco con cada lote de determinaciones y un Standard periódicamente. Desechar cuando las lecturas del Blanco sean superiores a 0,160 D.O. o las lecturas del Standard sean anormalmente bajas.

### MUESTRA

Suero o plasma

a) **Recolección:** se debe obtener suero o plasma de la manera usual.

b) **Aditivos:** en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda únicamente el uso de heparina como anticoagulante para su obtención.

c) **Sustancias interferentes conocidas:**

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la determinación.

- Los sueros con hemólisis visible o intensa producen valores falsamente aumentados por lo que no deben ser usados.

- En sueros fuertemente hiperlipémicos puede observarse turbiedad: en tal caso, diluir el volumen final de reacción a 1/2 ó 1/3 con Blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

- No interfieren: bilirrubina hasta 200 mg/l, ácido ascórbico hasta 75 mg/l, ácido úrico hasta 200 mg/l, ni hemólisis ligera.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) **Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** el colesterol en suero es estable 1 semana en refrigerador (2-10°C) y 2 meses congelado, sin agregado de conservadores.

#### MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas, pipetas y material volumétrico adecuados.
- Frasco de vidrio color caramelo.
- Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C (opcional).
- Reloj o timer.

#### CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
  - Temperatura de reacción: 37°C
  - Tiempo de reacción: 15 minutos
  - Volumen de muestra: 20 ul
  - Volumen de Reactivo de Trabajo: 2 ml
  - Volumen final de reacción: 2,02 ml
- Los volúmenes de Muestra y Reactivo pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente (Ej.: 10 ul de Muestra + 1 ml de Reactivo de Trabajo o 50 ul + 5 ml).

#### PROCEDIMIENTO

En tres tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Incubar 15 minutos en baño de agua a 37°C o 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Leer en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) o en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero con el Blanco.

#### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable dos horas, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

#### CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{colesterol (g/l)} = D \times f \quad \text{donde } f = \frac{2,00 \text{ g/l}}{S}$$

#### METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Standatrol S-E 2 niveles.

#### VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de colesterol:

Deseable: < 2,00 g/l

Moderadamente alto: 2,00 - 2,39 g/l

Elevado: ≥ 2,40 g/l

No obstante, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos o valores de referencia.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Otras causas de resultados erróneos son:

- Los reductores disminuyen la respuesta de color mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Dichos agentes son frecuentemente encontrados en el agua destilada empleada para preparar el Reactivo de Trabajo, por lo que se recomienda controlar la calidad de la misma.
- Los detergentes, metales pesados y cianuros son inhibidores enzimáticos.
- Incubación incorrecta. El nivel del agua en el baño no debe ser inferior al de los reactivos en los tubos.
- Uso del Standard de un equipo con los reactivos de otro. Los reactivos y el Standard de cada equipo forman un conjunto perfectamente controlado y estandarizado.

#### PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvo:

Nivel	D.S.	C.V.
1,57 g/l	± 0,033 g/l	2,32 %
2,90 g/l	± 0,065 g/l	2,23 %
4,71 g/l	± 0,102 g/l	2,13 %

b) **Recuperación:** agregando cantidades conocidas de colesterol a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 98 y 101%, para todo nivel de colesterol entre 1,90 y 4,79 g/l.

c) **Límite de detección:** depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida, el cambio mínimo de concentración detectable para 0,001 D.O. será aproximadamente de 0,007 g/l.

d) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 5 g/l. Para valores superiores, diluir 1/2 con el Blanco y repetir la lectura multiplicando el resultado final por 2.

#### PRESENTACION

Equipo para 250 ml de Reactivo de Trabajo (Cod. 1220101).

Equipo para 1000 ml de Reactivo de Trabajo (Cod. 1220102).

Empleando los reactivos de Colestat *enzimático* junto con HDL-Colesterol Reactivo Precipitante o HDL-Colesterol FT y LDL-Colesterol Reactivo Precipitante (provistos separadamente por Wiener lab.) es posible determinar el colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol) y a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol).

#### BIBLIOGRAFIA

- Allain, C.C. et al. - Clin. Chem. 20:470 (1974).
- American Health Foundation - Position statement on diet and coronary heart disease - pág. 255 (1972).
- Castelli, W.P. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Flegg, A.S. - Ann. Clin. Biochem. 10:79 (1973).
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3:459 F (1978).
- Trinder, P. - Ann. Clin. Biochem. 6:24 (1969).
- Coniglio R.I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 3rd ed., 1990.

Elaborado por:  
Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Fitobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Tec.: Wilma E. Celada  
Bioquímica  
Producto Inscripto M.S.  
Ctep. N°: 5983/83 - 5660/90



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina

# ANEXO 2



## TG Color GPO/PAP AA

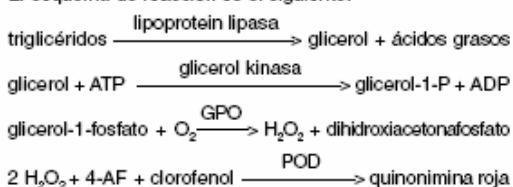
Método enzimático para la determinación de triglicéridos en suero o plasma

### SIGNIFICACION CLINICA

Los triglicéridos son lípidos absorbidos en la dieta y también producidos en forma endógena a partir de los carbohidratos. Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias. Estas enfermedades pueden tener origen genético o ser secundarias a otras tales como nefrosis, diabetes mellitus y disfunciones endócrinas. El aumento de triglicéridos se ha identificado como un factor de riesgo en enfermedades ateroscleróticas.

### FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema de reacción es el siguiente:



### REACTIVOS PROVISTOS

**Buffer:** solución de buffer Good conteniendo clorofenol, pH 7,5.  
**Enzimas:** viales conteniendo lipoprotein lipasa, glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF).  
**Standard:** solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivale a 2 g/l de trioleína).

### Concentraciones finales

Good .....	50 mmol/l; pH 7,5
clorofenol .....	2 mmol/l
lipoprotein lipasa .....	≥ 800 U/l
GK .....	≥ 500 U/l
GPO .....	≥ 1500 U/l
POD .....	≥ 900 U/l
ATP .....	2 mmol/l
4-AF .....	0,4 mmol/l

### REACTIVOS NO PROVISTOS

**Calibrador A plus** provisto separadamente por Wiener lab. cuando se emplea la técnica automática.

### INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Standard:** listo para usar.

**Reactivo de Trabajo:**

- 5/10 x 20 ml: agregar 20 ml de Buffer a un vial de Enzimas. Mezclar hasta disolución completa. Homogeneizar y fechar.
- 4 x 50 ml: reconstituir el contenido de un vial de Enzimas

con una porción de Buffer y luego transferir al frasco de Buffer enjuagando varias veces. Homogeneizar y fechar.

### PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

### ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**Reactivos Provistos:** son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

**Reactivo de Trabajo:** es estable 30 días en refrigerador (2-10°C).

### INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

El Reactivo de Trabajo puede presentar una coloración rosada que no afecta su funcionamiento.

Lecturas del Blanco superiores a 0,160 D.O. o lecturas del Standard anormalmente bajas, son indicios de deterioro del Reactivo. En tal caso, desechar.

### MUESTRA

Suero o plasma

**a) Recolección:** previo ayuno de 12 a 14 horas, obtener suero o plasma. Separar de los glóbulos rojos dentro de las 2 horas de extracción.

**b) Aditivos:** en caso de emplear plasma, se recomienda el uso de Anticoagulante W o heparina para su obtención.

**c) Sustancias interferentes conocidas:** los sueros con hemólisis intensa o marcadamente ictericos producen resultados erróneos, por lo que no deben ser usados.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

**d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** los triglicéridos en suero son estables 3 días en refrigerador (2-10°C). No congelar.

### MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

### CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o 490-530 nm en fotocolorímetro con filtro verde.

861110005/01 Pág. 1 de 4

- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de reactivo: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

#### PROCEDIMIENTO

Homogeneizar la muestra antes de usar, especialmente frente a sueros lechosos.

En tres tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
<b>Muestra</b>	-	-	10 ul
<b>Standard</b>	-	10 ul	-
<b>Reactivo de Trabajo</b>	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar, incubar 5 minutos a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Enfriar y leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con agua destilada.

#### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 60 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

#### CALCULO DE LOS RESULTADOS

Corregir las lecturas con el Blanco de reactivos y usar las lecturas corregidas para los cálculos.

$$TG \text{ g/l} = D \times \text{factor} \quad \text{factor} = \frac{2 \text{ g/l}}{S}$$

#### METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Standatrol S-E 2 niveles.

#### VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de Triglicéridos:

Deseable: < 1,50 g/l

Moderadamente elevado a elevado: 1,50 - 1,99 g/l

Elevado: 2,00 - 4,99 g/l

Muy elevado: ≥ 5,00 g/l

No obstante, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos o valores de referencia.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA. Los reductores disminuyen la respuesta de color, mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Las contaminaciones con glicerol producen resultados falsamente aumentados.

#### PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando simultáneamente replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
1,14 g/l	± 0,021 g/l	1,82 %
7,41 g/l	± 0,074 g/l	2,11 %

b) **Recuperación:** agregando cantidades conocidas de trioleína a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 99,2 y 100,7% para todo el rango de linealidad del método.

c) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 10 g/l de triglicéridos. Para valores superiores, repetir la determinación con muestra diluida 1:2 con solución fisiológica. Multiplicar el resultado obtenido por la dilución efectuada.

d) **Límite de detección:** depende del fotómetro empleado. En espectrofotómetros, el cambio mínimo de concentración detectable en las condiciones de reacción descritas, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O. será aproximadamente de 0,008 g/l.

#### PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Longitud de onda primaria .....	505 nm
Longitud de onda secundaria .....	700 nm
Tipo de reacción .....	punto final
Dirección de la reacción .....	aumenta
Temperatura de reacción .....	37°C
Relación muestra/reactivo .....	1:100
Tiempo de equilibrio .....	3 segundos
Tiempo de retardo .....	300 segundos
Tiempo de lectura .....	5-20 segundos
Absorbancia de Blanco .....	< 0,250 D.O.
Límite de absorbancia .....	2,000 D.O.
Linealidad .....	10 g/l

Para las instrucciones de programación debe consultarse el Manual del Usuario del Analizador en uso.

Para la calibración debe emplearse **Calibrador A plus** de Wiener lab., de acuerdo a los requerimientos del analizador.

#### PRESENTACION

- 5 x 20 ml (Cód. 1780107).

- 10 x 20 ml (Cód. 1780101).

- 4 x 50 ml (Cód. 1780105).

#### BIBLIOGRAFIA

- Fossati, P - Clin. Chem. 28/10:2077 (1982).
- McGowan, M.W.; et al - Clin. Chem. 29/3: 538 (1983).
- Tietz, N.W. - Fundamentals of Clin. Chem. - W.B., Saunders Co. - Philadelphia, Pa. (1970), pág. 329.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 3rd ed., 1990.

Elaborado por:  
Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Robamba 2044  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wienerlab.com.ar>  
Dir. Téc.: Mariana E. Calota  
Bioquímica  
Producto Inscrito M.S.  
Dsp. Nº: 2776/07 - 316/00  
Cert. Nº: 2068/07



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina