

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Evaluación de las características fisicoquímicas, toxicidad aguda y determinación del efecto hipolipemiante del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) cultivadas en el distrito de Mollepata-Anta-Cusco.**

**TESIS PRESENTADA POR:**

**Br. LISBETH HUARHUA YNQUILTUPA**  
**Br. ELIZABETH PUMA APAZA**

**PARA OPTAR AL TÍTULO**  
**PROFESIONAL DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**ASESORA:**

**Mgt. ANAHI KARINA CARDONA**  
**RIVERO**

**CUSCO – PERÚ**  
**2017**

**TESIS FINANCIADA POR EL CONSEJO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNSAAC**

## DEDICATORIA

Esta tesis quiero dedicarle,

A Jehová Dios, que me ha dado la vida y fortaleza para seguir adelante.

A mis queridos padres, Martin y Susana, por su amor, paciencia, apoyo incondicional y por estar ahí cuando más los necesité.

A mis queridas hermanas y mejores amigas, Yuliza y Vanessa, que siempre estuvieron ahí en los momentos difíciles dándome fuerzas y ánimo.

¡Son los más importantes en mi vida, los quiero mucho!

Atte. Lisbeth Huarhua Ynquiltupa

Esta tesis quiero dedicarle,

A Dios por darme la vida, por acompañarme en cada momento y por ayudarme a realizar uno de mis sueños.

A mis padres, Isidro Y Rufina, por inculcar en mí el deseo de superación y por su apoyo incondicional.

A mis hermanos Eder y Rebeca, por sus ánimos, apoyo, cariño y amor.

Atte. Elizabeth Puma Apaza

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, nuestra casa de estudios por habernos acogido en las aulas universitarias

Al instituto de investigación de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco, gracias por el apoyo y colaboración con el trabajo de investigación

A nuestra asesora en especial, **Mgt. Anahí Karina Cardona Rivero**, docente de la Escuela Profesional de Farmacia Y Bioquímica de La Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por brindarnos sus conocimientos, apoyo, ánimo y atención en todo momento en forma incondicional, en el trabajo de investigación.

A los **Ing. Mgt. Juan E. Moscoso Muñoz**, docente de la Escuela Profesional de Zootecnia y al **Quim. Jorge Choquenaira Pari**, por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Al **Quim. Ciro Tomaylla Cruz**, docente de la Escuela Profesional de Química, por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Al **Doctor Nerio Gongora Amaut**, jefe del área de Farmacología y a la **Mgt. Tatiana del Castillo de Loayza**, jefe de laboratorio de Ciencias Clínicas, a ambos por el apoyo con los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por el cual se pudo realizar el trabajo de investigación.

A nuestras amigas y compañeras de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica que estuvieron ahí para apoyarnos y animarnos en este trabajo de investigación.

Muchas gracias a todos.  
**Atte. Lisbeth y Elizabeth**

# INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
ABREVIATURAS .....	4

## CAPÍTULO I

### GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	6
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	8
1.3. OBJETIVOS.....	8
1.3.1. Objetivo general .....	8
1.3.2. Objetivos específicos .....	8
1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	9
1.4.1. Conocimiento .....	9
1.4.2. Aplicabilidad .....	10
1.4.3. Económico .....	10
1.5. HIPÓTESIS .....	10

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1. VISIÓN HISTÓRICA .....	11
2.2. ANTECEDENTES .....	12
2.2.1. Antecedentes internacionales.....	12
2.2.2. Antecedentes nacionales .....	14
2.2.3. Antecedentes locales .....	15
2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN .....	15
2.4. BASES TEÓRICAS.....	16
2.4.1. Colesterol.....	16
2.4.1.1. Importancia:.....	17
2.4.1.2. Síntesis .....	17
2.4.1.3. Regulación metabólica .....	18
2.4.2. Lipoproteínas plasmáticas.....	19
2.4.3. Triglicéridos.....	19
2.4.4. Hiperlipidemias.....	20
2.4.4.1. Definición .....	20
2.4.4.2. Tratamiento .....	20
2.4.5. Chía .....	22
2.4.5.1. Ubicación sistemática.....	24
2.4.5.2. Características botánicas .....	24
2.4.5.3. Valor nutricional de <i>salvia hispánica l.</i> (chía) .....	24
2.4.5.4. Propiedades de <i>salvia hispánica l.</i> (chía).....	25

2.4.5.5. Aceite de <i>salvia hispánica l.</i> (chía).....	26
2.4.6. Extracción de aceites por el método de soxhlet.....	27
2.4.7. Extracción de aceites por el extractor de fluidos supercríticos.....	28
2.4.8. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	29
2.4.9. Fundamento del método de la determinación del colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos.....	30
2.4.10. Fundamento para la determinación de la absorción aparente del aceite de chia en el tracto gastrointestinal de los animales de experimentación.....	30
2.4.11. Fundamento para la determinación de la presencia del aceite de chía en el estómago e intestino delgado de los animales de experimentación.....	31
2.4.12. Fundamento para determinar la influencia del pH del tracto gastrointestinal de los animales de experimentación, en la emulsión del aceite de chía.....	32
2.4.13. Fundamento de la hidrólisis enzimática de los lípidos.....	32
2.4.14. Definición de terminos.....	33

### CAPÍTULO III

#### MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.....	35
3.1.1. Materiales biológicos:.....	35
3.1.1.1. Muestra vegetal:.....	35
3.1.1.2. Animales de experimentación:.....	35
3.1.2. Materiales e instrumentos:.....	35
3.1.2.1. Materiales de laboratorio.....	35
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN Y DISEÑO METODOLÓGICO.....	37
3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:.....	37
3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
3.5. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN.....	40
3.6. PROCEDIMIENTOS.....	44
3.6.1. Proceso de extracción del aceite crudo de las semillas de <i>salvia hispánica l.</i> (chía), por el equipo de soxhlet.....	44
1. Selección y limpieza.....	44
2. Pesado.....	44
3. Secado.....	44
4. Molienda y triturado.....	44
5. Extracción por solventes.....	44
3.6.2. Proceso de extracción del aceite de las semillas de <i>salvia hispánica l.</i> (chía), por el extractor de fluidos supercríticos.....	46
3.6.3. Determinación de las características fisicoquímicas del aceite.....	48
3.6.3.1. Densidad:.....	48
3.6.3.2. Índice de refracción.....	48
3.6.3.3. Características químicas del aceite de <i>salvia hispánica l.</i> (chía).....	48
3.6.3.4. Flujograma de las características químicas para el aceite de las semillas de chía ( <i>salvia hispánica l.</i> ).....	50
3.6.4. Determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	54
3.6.5. Método para evaluar toxicidad aguda y el efecto hipolipemiante.....	56
3.6.5.1. Procedimiento para la determinación de la toxicidad aguda.....	56

3.6.5.2. procedimiento de la determinación del efecto hipolipemiente .....	58
3.6.5.3. Procedimiento de administración por vía oral .....	60
3.6.5.4. Procedimiento para la toma de muestra por la cola .....	60
3.6.6. Procedimiento para determinación cuantitativa de la absorción aparente del aceite de chia en el tracto gastrointestinal en los animales de experimentación. ....	61
3.6.7. Procedimiento para determinar la presencia del aceite de chia ( <i>salvia hispánica l.</i> ) En el estómago e intestino delgado de la rata de experimentación (observación al microscopio).....	63
3.6.8. Procedimiento para la determinación “in vitro” de la influencia de los pH del tracto gastrointestinal de los animales de experimentación en la emulsión del aceite de chia ( <i>salvia hispánica l.</i> ).....	65
3.6.9. Procedimiento para la determinación “in vitro” de la influencia de la bilis en la hidrólisis enzimática del aceite de chia ( <i>salvia hispánica l.</i> ) .....	67
3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	70
3.8. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PORCENTAJE DE HUMEDAD .....	72
4.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.....	73
4.2.1. Extracción del aceite de <i>salvia hispánica l.</i> (chia) en equipo de soxhlet. ....	73
4.2.2. Extracción del aceite de <i>salvia hispánica l.</i> (chia) en el extractor de Fluido Supercríticos (FSC).....	73
4.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA L. (CHIA).....	74
4.4. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES .....	76
4.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE .....	79
4.5.1. Análisis de varianza unifactorial del perfil lipídico .....	85
4.5.2. Duncan para subconjuntos.....	87
4.6 DE LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.....	95
4.7. DE LA DETERMINACIÓN DE LA ABSORCIÓN APARENTE DEL ACEITE EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS RATAS DE EXPERIMENTACIÓN.....	98
4.8. DE LA INFLUENCIA DE LA BILIS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE SALVIA HISPÁNICA L. CHIA .....	99
4.9. DE LA INFLUENCIA DEL PH GASTROINTESTINAL, EN LA EMULSIÓN DEL ACEITE DE SALVIA HISPÁNICA L. (CHÍA). ....	100
4.10. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL ACEITE DE SALVIA HISPÁNICA L. (CHÍA) EN EL ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO DE LAS RATAS DE EXPERIMENTACIÓN. ....	101
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>103</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>114</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratas y ratones .....	115
<b>Anexo 2:</b> Condiciones de análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. ....	117
<b>Anexo 3:</b> Análisis microbiológico del aceite de salvia hispánica I. (chía).....	118
<b>Anexo 4:</b> Constancia de extracción del aceite de las semillas de salvia hispánica I. Chia .....	119
<b>Anexo 5:</b> Constancia del análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases .....	120
<b>Anexo 6:</b> Certificado sanitario de los animales de experimentación (rata albina) .....	121
<b>Anexo 7:</b> Certificado de sanitario de los animales de experimentación (raton albino) .....	122
<b>Anexo 8:</b> Método enzimático para la determinación del colesterol total en suero o plasma .....	123
<b>Anexo 9:</b> Método enzimático para la determinación en suero del LDL-colesterol.....	126
<b>Anexo 10:</b> Método enzimático para determinar el HDL-colesterol en suero.....	129
<b>Anexo 11:</b> Método enzimático para determinar los triglicéridos en suero. ....	132
<b>Anexo 12:</b> Anexo fotográfico.....	135
<b>Anexo 13:</b> Formato para la recolección de datos en la determinación del colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos.....	150
<b>Anexo 14:</b> Formato usado para el control de administración del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	151
<b>Anexo 15:</b> Formato usado para el apunte de las características fisicoquímicas del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía) .....	152
<b>Anexo 16:</b> Formato usado para la recolección de datos en la extracción del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	152
<b>Anexo 17:</b> Formato usado para la recolección de datos para determinar la toxicidad aguda en ratones. ....	153
<b>Anexo 18:</b> Formato usado para el control de pesos en la determinación de la toxicidad aguda. .	153

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Valor nutricional de las semillas de salvia hispánica I. (chía) .....	24
<b>Tabla 2:</b> Cantidad en porcentaje de ácidos grasos del aceite de salvia hispánica I. (chía) en los diferentes países de américa del sur.....	27
<b>Tabla 3:</b> Determinación del porcentaje de humedad del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	72
<b>Tabla 4:</b> Determinación del porcentaje de rendimiento de la extracción del aceite de la salvia hispánica I. (chía) en el equipo de soxhlet.....	73
<b>Tabla 5:</b> Determinación del porcentaje de rendimiento de la extracción del aceite de salvia hispánica I. (chía) en el extractor de fluidos supercríticos (FSC).....	73
<b>Tabla 6:</b> Resultados de las características fisicoquímicas del aceite de salvia hispánica I. (chía) .	74
<b>Tabla 7:</b> Contenido de ácidos grasos en el aceite de salvia hispánica I. (chía).....	76
<b>Tabla 8:</b> Análisis por el método de la prueba "T" del perfil lipídico para el grupo control negativo.	79
<b>Tabla 9:</b> Análisis por el método de la prueba "T" del perfil lipídico para el grupo control positivo (atorvastatina 10 mg/kg).....	80
<b>Tabla 10:</b> Análisis por el método de la prueba "T" del perfil lipídico para el grupo de ratas con aceite de salvia hispánica I. (chía) a dosis de (0.5 ml/kg).....	81
<b>Tabla 11:</b> Análisis por el método de la prueba "T" del perfil lipídico para el grupo de ratas con aceite de salvia hispánica I. (chía) a dosis de (1 ml/kg) .....	82
<b>Tabla 12:</b> Análisis por el método de la prueba "T" del perfil lipídico para el grupo de ratas con aceite de salvia hispánica I. (chía) a dosis de (2 ml/kg) .....	83
<b>Tabla 13:</b> Anova de un factor .....	85
<b>Tabla 14:</b> Análisis de varianza (anova) para el efecto hipolipemiente en ratas albinas.....	86
<b>Tabla 15:</b> Análisis por el método de duncan para subconjuntos homogéneos en el colesterol total. ....	87
<b>Tabla 16:</b> Análisis por el método de duncan para subconjuntos homogéneos en el LDL-colesterol total. ....	89

<b>Tabla 17:</b> Análisis por el método de duncan para subconjuntos homogéneos en el HDL-colesterol total.....	91
<b>Tabla 18:</b> Análisis por el método duncan para subconjuntos homogéneos en los triglicéridos.....	93
<b>Tabla 19:</b> Mortalidad y supervivencia con el aceite de salvia hispánica I. (chía).....	95
<b>Tabla 20:</b> Variación del peso según dosis del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía) .	96
<b>Tabla 21:</b> Resultados de la determinación de la grasa absorbida aparente.....	98
<b>Tabla 22:</b> Resultados de la influencia de la bilis y la pancreatina en la hidrólisis del aceite de salvia hispánica I. (chía).....	99

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Resumen de los fármacos hipolipemiantes .....	21
<b>Cuadro 2:</b> Criterios de inclusión y exclusión de la especie vegetal y animal. ....	37
<b>Cuadro 3:</b> Operacionalización de las variables implicadas.....	40
<b>Cuadro 4:</b> Operacionalización de las variables no implicadas. ....	42
<b>Cuadro 5:</b> Métodos utilizados para la determinación de las características químicas del aceite.....	49
<b>Cuadro 6:</b> Técnicas e instrumentos de recolección de datos de las características fisicoquímicas, extracción del aceite, efecto hipolipemiante y toxicidad aguda.....	70
<b>Cuadro 7:</b> Técnicas de procesamiento de análisis estadístico de datos del efecto hipolipemiante y toxicidad aguda.....	71
<b>Cuadro 8:</b> Influencia del pH gastrointestinal en la emulsión del aceite de salvia hispánica I. (chía). ....	100
<b>Cuadro 9:</b> Observación microscópica del aceite de salvia hispánica I. (chía). ....	101
<b>Cuadro 10:</b> Condiciones para el análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. ....	117
<b>Cuadro 11:</b> Resultados del análisis microbiológico del aceite de salvia hispánica I. (chía).....	118

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura química del colesterol.....	16
<b>Figura 2:</b> La planta de salvia hispánica I. (chía).....	23
<b>Figura 3:</b> Semillas de salvia hispánica I. (chía).....	23
<b>Figura 4:</b> Equipo de extracción de aceites soxhlet.....	28
<b>Figura 5:</b> Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	30
<b>Figura 6:</b> Administración por vía oral.....	60
<b>Figura 7:</b> Toma de muestra para el análisis bioquímico.....	61

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Perfil cromatográfico (GC-Masas) del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía). ....	77
<b>Gráfico 2:</b> Gráfico para el colesterol total .....	88
<b>Gráfico 3:</b> Gráfico para LDL-colesterol.....	90
<b>Gráfico 4:</b> Gráfico para HDL-colesterol.....	92
<b>Gráfico 5:</b> Gráfico para triglicéridos.....	94
<b>Gráfico 6:</b> Determinación de la DL50 del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	97



## ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

<b>Flujograma 1:</b> Extracción del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía) en equipo de soxhlet.....	45
<b>Flujograma 2:</b> Extracción del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía), por fluidos supercríticos.....	47
<b>Flujograma 3:</b> Índice de yodo.....	50
<b>Flujograma 4:</b> Índice de peróxidos.....	51
<b>Flujograma 5:</b> Índice de saponificación.....	52
<b>Flujograma 6:</b> Índice de acidez.....	53
<b>Flujograma 7:</b> Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	55
<b>Flujograma 8:</b> Determinación de la toxicidad aguda.....	57
<b>Flujograma 9:</b> Efecto hipolipemiante en animales de experimentación ratas.....	59
<b>Flujograma 10:</b> Determinación cuantitativa de la absorción aparente del aceite de chia en el tracto gastrointestinal en los animales de experimentación.....	62
<b>Flujograma 11:</b> Determinación de la presencia del aceite de chía (salvia hispánica I.) En el estómago e intestino de la rata de experimentación (observación al microscopio). ....	64
<b>Flujograma 12:</b> Determinación "in vitro" de la influencia de los ph del tracto gastrointestinal en la emulsión del aceite de chía (salvia hispánica I.).....	66
<b>Flujograma 13:</b> Determinación "in vitro" de la influencia de la bilis en la hidrólisis enzimática del aceite de las semillas de chia (salvia hispánica I.).....	68
<b>Flujograma 14:</b> Flujograma general de los procesos de investigación.....	69

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía N° 1:</b> Semillas de salvia hispánica I. (chía).....	135
<b>Fotografía N° 2:</b> Selección y pesado de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	135
<b>Fotografía N° 3:</b> Secado de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	135
<b>Fotografía N° 6:</b> Extracción del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía) en equipo de fluidos súper críticos.....	136
<b>Fotografía N° 7:</b> Aceite obtenido de la extracción en fluidos supercríticos.....	136
<b>Fotografía N° 8:</b> Determinación de la densidad del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	137
<b>Fotografía N° 9:</b> Determinación del índice de refracción del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía). ....	137
<b>Fotografía N° 10:</b> Titulación de la muestra para determinar el índice de yodo.....	137
<b>Fotografía N° 11:</b> Proceso de titulación para la determinación del índice de acidez.....	138
<b>Fotografía N° 12:</b> Titulación de la muestra para determinar el índice de peróxidos.....	138
<b>Fotografía N° 13:</b> Cambio de color de la muestra después de la titulación para determinación del índice de peróxidos.....	138
<b>Fotografía N° 14:</b> Preparación de la muestra para determinación del índice de saponificación.....	139
<b>Fotografía N° 15:</b> Grupo de ratones usados para la determinación de la toxicidad aguda del aceite de las semillas de salvia hispánica I. (chía).....	139
<b>Fotografía N° 16:</b> Distribución de los animales de experimentación en grupo de a 6.....	140
<b>Fotografía N° 17:</b> Administración de aceite de salvia hispánica I. (chía).....	140
<b>Fotografía N° 18:</b> Extracción de las muestras de sangre de los animales de experimentación.....	140
<b>Fotografía N° 19:</b> Muestra de sangre para determinar el perfil lipídico.....	140
<b>Fotografía N° 20 y fotografía N° 21:</b> Muestras para dar lectura del colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos en el espectrofotómetro.....	141
<b>Fotografía N° 22:</b> Lectura en el espectrofotómetro.....	141
<b>Fotografía N° 23:</b> Se muestra los resultados de la lectura realizada en el espectrofotómetro.....	141
<b>Fotografía N° 24:</b> Preparación de los diferentes valores de pH.....	142

<b>Fotografía N° 25:</b> Incubación de los diferentes valores de ph más el aceite de las semillas de salvia hispánica l. (chía).....	142
<b>Fotografía N° 26:</b> Observación de la influencia del ph sobre el aceite de chía más la bilis.....	142
<b>Fotografía N° 27:</b> Grupo de ratas para la determinación de la grasa absorbida aparente.....	143
<b>Fotografía N° 28:</b> Heces recolectadas para determinar la grasa eliminada.....	143
<b>Fotografía N° 29:</b> Extracción de aceite de las heces, en el equipo de soxhlet.....	143
<b>Fotografía N° 30:</b> Aceite extraído de las heces de ratas.....	143
<b>Fotografía N° 31:</b> Disección del animal de experimentación para extraer el estómago e intestinos.....	144
<b>Fotografía N° 32:</b> Medición del intestino delgado para obtención de muestras.....	144
<b>Fotografía N° 33:</b> Extracción de muestra del estómago.....	144
<b>Fotografía N° 34:</b> Muestras listas para observar al microscopio.....	144
<b>Fotografía N° 35:</b> Observación al microscopio.....	145
<b>Fotografía N° 36:</b> Observación al microscopio en 10x del estómago a las dos horas del grupo blanco.....	145
<b>Fotografía N° 37:</b> Observación al microscopio en 10x del intestino a las dos horas del grupo blanco.....	145
<b>Fotografía N° 38:</b> Observación al microscopio en 40x del estómago a las dos horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	146
<b>Fotografía N° 39:</b> Observación al microscopio en 40x del intestino a las dos horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	146
<b>Fotografía N° 40:</b> Observación al microscopio en 40x del estómago a las 4 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	146
<b>Fotografía N° 41:</b> Observación al microscopio en 40x del intestino a las 4 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	146
<b>Fotografía N° 42:</b> Observación al microscopio en 40x del estómago a las 8 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	147
<b>Fotografía N° 43:</b> Observación al microscopio en 40x del intestino a las 8 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	147
<b>Fotografía N° 44:</b> Observación al microscopio en 10x del intestino a las 12 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	147
<b>Fotografía N° 45:</b> Observación al microscopio en 40x del intestino a las 12 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	147
<b>Fotografía N° 46:</b> Observación al microscopio en 10x del estómago a las 24 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	148
<b>Fotografía N° 47:</b> Observación al microscopio en 40x del intestino a las 24 horas del grupo de ratas con aceite de chía.....	148
<b>Fotografía N° 48:</b> Tubos con muestra de aceite de chía y bilis de vacuno.....	148
<b>Fotografía N° 49:</b> Titulación de las muestra con aceite de chía, bilis y pancreatina al 1%.....	148
<b>Fotografía N° 50:</b> Titulación de las muestras de aceite de chía con la bilis y la pancreatina.....	149
<b>Fotografía N° 51:</b> Resultados de la titulación en la hidrolisis de los lípidos.....	149

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue, evaluar las características fisicoquímicas, toxicidad aguda y determinar el efecto hipolipemiente del aceite de las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía), cultivadas en el distrito de Mollepata – Anta – Cusco.

Para cual se realizó una investigación cuasiexperimental, con preprueba y post prueba. Para el efecto hipolipemiente se utilizó 30 ratas albinas de raza Holtzman con una dieta hiperlipídica durante 30 días, se les dividió en 5 grupos, al primero, segundo y tercer grupo se les administró 0.5, 1 y 2 mL/kg del aceite de chía, al cuarto atorvastatina y al quinto grupo suero fisiológico. En la toxicidad aguda se utilizó 28 ratones albinos con dosis crecientes de 4,8, 16, 32, 64, 96 y 128 mL/kg del aceite de chía. También se determinó las características fisicoquímicas del aceite de chía, según las Normas Técnicas Peruanas y CODEX.

Los resultados del efecto hipolipemiente, se tuvo que la mejor dosis fue de 2 mL/kg, existiendo diferencias estadísticamente significativas en la reducción de los niveles séricos de colesterol total en promedio en 29.24 mg/dL, LDL-colesterol en 29.01 mg/dL y triglicéridos en 12.18 mg/dL, mas no teniendo efecto en el incremento de los niveles de HDL-colesterol, para las pruebas de ANOVA y Post ANOVA, En la toxicidad aguda la DL50 fue 112.59 mL/kg de peso y los resultados de las características fisicoquímicas del aceite de chía fueron, densidad (0.925 g/mL), índice de refracción (1.482), índice de acidez (1.03 mg de KOH/100 g de aceite), índice de yodo (189.08 g de yodo/100 g de aceite), índice de peróxidos (5.7 meq O<sub>2</sub> activo/kg de aceite), índice de saponificación (184.30 mg KOH/100 g de aceite).

En conclusión presenta efecto hipolipemiente a dosis de 2 mL/kg disminuyendo significativa los niveles de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos, este aceite es inocuo y presentó valores adecuados para las características fisicoquímicas según las normas CODEX.

**PALABRAS CLAVES:** Hipolipemiente, aceite de chía, toxicidad aguda, DL50, atorvastatina, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos.

## ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate the physicochemical characteristics, acute toxicity and to determine the lipid - lowering effect of the oil of the seeds of *Salvia hispánica L.* (chia), cultivated in the district of Mollepata - Anta - Cusco.

For which a quasi-experimental research was carried out, with pre-test and post-test. For the hypolipidemic effect, 30 Holtzman albino rats were used with a hyperlipid diet for 30 days, divided into 5 groups, the first, second and third groups were given 0.5, 1 and 2 mL / kg of chia oil, To the fourth atorvastatin and to the fifth group physiological serum. In acute toxicity, 28 albino mice were used with increasing doses of 4.8, 16, 32, 64, 96 and 128 mL / kg of chia oil. The physicochemical characteristics of chia oil were also determined according to Peruvian technical standards and CODEX.

The results of the lipid-lowering effect had the best dose was 2 mL / kg, there were statistically significant differences in the reduction of serum total cholesterol levels on average by 29.24 mg / dL, LDL-cholesterol by 29.01 mg / dL and Triglycerides at 12.18 mg / dL but had no effect on the increase in HDL cholesterol levels for ANOVA and Post ANOVA tests. In acute toxicity the LD50 was 112.59 mL / kg body weight and the results of the characteristics (0.925 g / mL), refractive index (1.482), acidity index (1.03 mg KOH / 100 g oil), iodine index (189.08 g iodine / 100 g oil) ), Peroxide index (5.7 meq O<sub>2</sub> active / kg oil), saponification index (184.30 mg KOH / 100 g oil).

In conclusion, it has a lipid-lowering effect at doses of 2 mL / kg, with a significant reduction in total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides levels. This oil is harmless and has adequate values for the physicochemical characteristics according to CODEX standards.

**KEY-WORDS:** Hipolipemiant, chia oil, acute toxicity, LD50, atorvastatin, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides.

# INTRODUCCIÓN

Hoy en la actualidad las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), están siendo muy utilizadas con fines nutricionales, adelgazantes e hipolipemiente, a parte de las cuales se le atribuye otras propiedades más. En este trabajo de investigación nos centramos en su efecto hipolipemiente, del aceite de las semillas de chía dando a conocer farmacológicamente a que se debe dicho efecto, así poder contribuir científicamente en la prevención y reducción de las hiperlipidemias en la población, puesto que las alteraciones metabólicas de los lípidos son los principales problemas de salud a nivel mundial y la situación es cada vez más seria por el aumento de la prevalencia de la obesidad en muchos países. Según la OMS se estimó que más de 16 millones de las muertes atribuidas a las enfermedades no transmisibles se producen en menores de 70 años de edad, esto debido a las dietas malsanas, lo que puede manifestarse en hiperlipidemias <sup>(1)</sup>. Se ha estimado que para el año 2030 el número de personas que las padecerán pasara de 13.3 millones a 32.9 millones, es decir un incremento de más del doble <sup>(1)</sup>. Además, su elevada prevalencia, aumentan el riesgo de morbilidad y muerte por diversas enfermedades y se convierten en un problema de salud en el mundo y en nuestro país por los graves daños que provoca en los pacientes afectados.

Conociendo mejor las propiedades farmacológicas del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (Chía), nos dará una alternativa natural en el tratamiento de las enfermedades ya mencionadas. Por estas razones el presente trabajo de investigación evaluó las características fisicoquímicas, con el fin de conocer el estado y composición del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (Chía), la toxicidad aguda para determinar la DL50 y se evaluó el efecto hipolipemiente.

## ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	: Análisis de varianza
<b>ATP</b>	: Adenosín trifosfato
<b>COA</b>	: Coenzima A
<b>CODEX</b>	: Norma alimentaria internacional
<b>DIGESA</b>	: Dirección general de salud
<b>DL50</b>	: Dosis letal media
<b>ECC</b>	: Enfermedad cardiaca coronaria
<b>ENT</b>	: Enfermedad no transmisible
<b>FAO</b>	: Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.
<b>FDA</b>	: Administración de alimentos y medicamentos
<b>FSC</b>	: Fluidos súper críticos
<b>gl</b>	: Grados de libertad
<b>HDL</b>	: High density lipoprotein/ Lipoproteína de alta densidad
<b>HMG-COA</b>	: Hidroximetilglutaril coenzima A
<b>INDECOPI</b>	: Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual.
<b>Kg</b>	: kilogramos
<b>LDL</b>	: Low density lipoprotein/ Lipoproteína de baja densidad
<b>VLDL</b>	: Very low-density lipoprotein/ Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>ml</b>	: Mililitros
<b>NTP</b>	: Norma técnica peruana
<b>OMS</b>	: Organización mundial de la salud
<b>pH</b>	: Potencial de hidrogeniones
<b>S.F.</b>	: Suero fisiológico
<b>UFC</b>	: Unidades formadoras de colonias
<b><math>\omega</math>-3</b>	: omega 3
<b><math>\omega</math>-6</b>	: Omega 6

- IR** : Índice de refracción
- PPAR** : Proliferadores de peroxisoma activado por los receptores.
- AMPc** : Adenosín monofosfato cíclico
- AGE** : Ácidos grasos esenciales
- CG/MS** : Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
- AGPIs** : Ácidos grasos polinsaturados
- RNAm** : Ácido ribonucleico mensajero
- SREBP-1** : Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides.

# CAPÍTULO I

## GENERALIDADES

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía) fueron muy utilizadas por los mayas y aztecas, por sus propiedades nutricionales y medicinales, es así que desde el año 1991 la chía resurgió y hasta la actualidad está siendo utilizada. Según el autor Di Sapio, las semillas de chía aportan diferentes efectos como antioxidante, antiinflamatorio laxante, hipotensor, hipocolesterolemiante, hipoglucemiante, inmunoestimulante, tónico cardíaco, nervioso y como alimento mineralizante, vitamínico y proteico, etc. <sup>(2)</sup>

Sin embargo no hay estudios científicos que avalen estas propiedades medicinales, y según la OMS mencionó que en muchos países, bastantes personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que «natural» es sinónimo de inocuo <sup>(3)</sup>.

Sin embargo, a medida que aumenta el uso de las medicinas tradicionales o alternativas, también aumenta el número de informes sobre reacciones adversas. Y estos productos medicinales tradicionales o alternativos son de venta libre. En una encuesta realizada por la OMS en 142 países, 99 de ellos respondieron que la mayoría de esos productos podía adquirirse sin prescripción <sup>(3)</sup>.

Esas tendencias plantean dudas acerca de la calidad de los productos utilizados, su idoneidad terapéutica en cada caso, y la falta de seguimiento médico <sup>(3)</sup>.

La OMS apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo», según declaró el Dr. LEE Jong-wook, Director General de la OMS. «Pero a medida que aumenta el número de personas que utiliza esas medicinas, los gobiernos deben contar con instrumentos para garantizar que todos los interesados dispongan de la mejor información sobre sus beneficios y riesgos.» <sup>(3)</sup>.

Estas razones nos ayudan a ver la necesidad de hacer investigaciones de las plantas medicinales, como en este caso acerca del aceite de chía, para evaluar el efecto hipolipemiante, si presenta toxicidad y tiene las características adecuadas para así poder recomendar para la prevención y curación de las hiperlipidemias



que afectan a un elevado porcentaje de la población y son las causantes de contribuir al desarrollo de otras enfermedades lo cual puede ocasionar una alta mortalidad.

Según la OMS en el 2011 se mencionó que las enfermedades no transmisibles (ENT) matan a 38 millones de personas cada año. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte por ENT (48%). Se calcula que los factores comportamentales, entre ellos, el consumo de tabaco, el sedentarismo, la dieta malsana y el uso nocivo del alcohol, son responsables de alrededor del 80% de las coronariopatías y enfermedades cerebrovasculares <sup>(1)</sup>.

Estos factores de riesgo comportamentales provocan cuatro alteraciones metabólicas o fisiológicas las cuales son: elevación de la tensión arterial, aumento de peso que conduce a obesidad, hiperglucemia e hiperlipidemia que tienen numerosos efectos. Cada año mueren en el mundo 2,8 millones de personas debido al sobrepeso o la obesidad. Ambos factores pueden ejercer efectos metabólicos adversos sobre la tensión arterial y las concentraciones de colesterol y triglicéridos, y causar diabetes. Por consiguiente, el sobrepeso y la obesidad aumentan el riesgo de padecer coronariopatías, accidentes cerebrovasculares isquémicos, diabetes mellitus de tipo 2 o diversos tipos de cáncer frecuentes <sup>(1)</sup>.

Las hiperlipidemias pueden definirse como un exceso de las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos o de ambos a la vez. La hiperlipidemia es la manifestación de una alteración en la síntesis y/o degradación de las lipoproteínas plasmática y puede ser también el reflejo de una dieta rica en grasas <sup>(4)</sup>.

Existe una enorme variedad de fármacos útiles en el tratamiento de las hiperlipidemias, entre los que se encuentran las resinas de intercambio iónico, como la resina colestiramina; el ácido nicotínico; los fibratos; el probucol; y las estatinas, que son los fármacos de más reciente aparición, como la lovastatina, la simvastatina o la pravastatina <sup>(5)</sup>. Sin embargo, como cualquier medicamento estos pueden presentar algunas reacciones adversas sean leves o severas.

La Salvia hispánica L. (chía), hoy en día está siendo cultivada en varios países como Bolivia, Argentina y Perú. Por lo cual en nuestro país ya se está cultivando en diferentes departamentos como es Ayacucho y Cusco en su distrito de Mollepata perteneciente a la provincia de Anta.

Aunque se está cultivando en otros países, podemos decir que la composición de las semillas varía de acuerdo al lugar de cultivo. Puesto que la composición química de las semillas está determinada genéticamente pero las cantidades relativas pueden variar en función de factores ambientales como la presencia de nutrientes minerales o el clima. <sup>(61)</sup>

De ahí la importancia de probar científicamente el efecto farmacológico del aceite de las semillas de chía sobre las hiperlipidemias y así también de realizar el estudio fisicoquímico, toxicidad aguda, puesto que no se encontraron estudios de dicho efecto y demás propiedades farmacológicas del aceite de las semillas de chía, sin embargo se encontró estudios realizados de su composición y sus características nutricionales.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Cuáles serán las características fisicoquímicas, la toxicidad aguda y presentará efecto hipolipemiente el aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) cultivadas en el distrito de Mollepata-Anta-Cusco?

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

1. Evaluar las características fisicoquímicas, la toxicidad aguda y determinar el efecto hipolipemiente del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) cultivadas en el distrito de Mollepata-Anta-Cusco.

### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Extraer el aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), por el equipo de Soxhlet y Fluidos supercríticos.
2. Determinar las características fisicoquímicas del aceite de la *Salvia hispánica L.* (chía).
3. Determinar el perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

4. Evaluar la toxicidad aguda, por vía oral en animales de experimentación (ratones).
5. Evaluar el efecto hipolipemiente de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) en los niveles de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos en animales de experimentación (ratas).
6. Evaluar y comparar el efecto hipolipemiente del aceite de *Salvia hispánica L.* (chía), y el fármaco de referencia (atorvastatina).
7. Comprobar “In vitro” la influencia de los diferentes pH del tracto gastrointestinal de la rata de experimentación, en la emulsión del aceite de *Salvia hispánica L.* (chía).
8. Determinar cuantitativamente la absorción aparente del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), en el tracto gastrointestinal de los animales de experimentación.
9. Determinar la presencia del aceite de *Salvia hispánica L.* (chía), a diferentes horas, en el estómago e intestino delgado de los animales de experimentación.
10. Determinar la influencia de la bilis en la hidrólisis enzimática del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía).

## **1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.4.1. CONOCIMIENTO**

Los aceites de origen vegetal en su mayoría están compuestos de omega 3 y omega 6, quienes serían los responsables de: El efecto hipolipemiente, proteger de enfermedades cardiacas a futuro y del efecto antiinflamatorio, además hay un interés creciente en el papel que pueden desempeñar estos ácidos grasos como el omega-3 en la prevención de la diabetes y ciertos tipos de cáncer. Siendo así es muy probable que el aceite extraído de las semillas de *Salvia hispánica L.* (Chía) también contenga estos ácidos grasos y presente un efecto hipolipemiente. De ahí la importancia de investigar mejor las propiedades del aceite de las semillas de chía, para así contribuir en la salud, teniendo un conocimiento científico que recomiende su uso con un fin terapéutico.

### **1.4.2. APLICABILIDAD**

Al conocer las propiedades farmacológicas del aceite de chía, puede beneficiar en la prevención, tratamiento y como coadyuvante en el tratamiento de las hiperlipidemias y así disminuir el riesgo de padecer otras enfermedades a causa de estas.

Puesto que una de las principales causas de las hiperlipidemias es la dieta rica en grasas saturadas, la utilización del aceite de chía en la dieta diaria serviría para prevenir estas enfermedades, sobre todo en los jóvenes, pues se recomienda hacerse un chequeo desde los 20 años, sin embargo no solo la dieta es un factor de riesgo, también están los hereditarios como trastornos genéticos, la diabetes, el hipotiroidismo, etc; nos pueden llevar a desarrollar hiperlipidemias, en estos casos puede el aceite de chía puede contribuir en la mejora de estos pacientes disminuyendo los niveles de colesterol malo, así también puede usarse como coadyuvante en el tratamiento de las hiperlipidemias.

### **1.4.3. ECONÓMICO**

Los costos de tratamiento y cuidado de las complicaciones de estas enfermedades representan una elevada inversión para nuestro sistema de salud y aseguradoras; esto sin mencionar el gasto catastrófico que significa para una persona y su familia cuando no tienen acceso a algún tipo de seguridad social.

El aceite de chía puede aminorar los gastos que conllevan las enfermedades como las hiperlipidemias y las relacionadas a estas, ya que si se utiliza en la prevención y tratamiento, puede ser beneficioso en la economía de cada familia, así también del Perú.

### **1.5. HIPÓTESIS**

El aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), cultivadas en el distrito de Mollepata – Anta – Cusco, presenta características fisicoquímicas dentro de los parámetros de la norma CODEX, no presenta toxicidad aguda y tiene efecto hipolipemiante.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1. VISIÓN HISTÓRICA

En la época Precolombina, la *Salvia hispánica L.* (chía) era uno de los alimentos básicos para las civilizaciones que se asentaron en América Central y México <sup>(6)</sup>.

La chía fue desplazada como uno de los alimentos básicos por los cereales provenientes de Europa; así el cultivo de la chía desapareció durante la colonia; sólo logró sobrevivir en áreas montañosas aisladas de México, donde se cultiva comercialmente desde hace siglos y hasta la fecha <sup>(2)</sup>.

El mayor centro productor de México está en Acatic, Jalisco, de donde se exportan cantidades crecientes a Japón, Estados Unidos y Europa <sup>(7)</sup>.

La chía reaparece en 1991 debido a que en numerosos trabajos médico-científicos se reconocen sus propiedades y de ahí se desarrolla más el cultivo. En los años 90 se inició el cultivo experimental de la chía en el norte de Argentina (Catamarca, Salta y Tucumán), como cultivo alternativo, con resultados muy positivos. Los rendimientos del proyecto alcanzaron con contenidos de aceite cercanos al 39%. Parte de estas producciones se exportan a EE. UU <sup>(6)</sup>.

La semilla de *Salvia hispánica L.* (Chía) fue cultivada por los aztecas y los mayas, les proporcionaba fuerza y vigorosidad debido a los valores nutricionales <sup>(8)</sup>. La *Salvia hispánica L.* (chía), aporta ácidos grasos esenciales (Omega-3 y omega - 6), estos se encargan de estimular las células del cerebro, para mejorar la concentración y regular la presión arterial, es rica en antioxidantes, vitamina B, pero de lo que más se puede destacar es su alta cantidad en fibra soluble, la cual reduce la absorción del Colesterol y un buen aliado a la hora de hacer una dieta saludable. Algunos expertos anuncian que las semillas de Chía es un buen alimento para reforzar forma física y mental, a la vez que asimilamos valores nutricionales ideales para una vida más sana, estas semillas no tienen olor ni sabor, facilitan la digestión y facilitan el control del apetito <sup>(9)</sup>.

La Chía, fue considerada como “suplemento dietético” por la FDA (Food and Drug Administration, USA), tiene 100% más potasio que el plátano, 100% más fibra que cualquier cereal en hojuelas, 200% más hierro que la espinaca, 700% más

omega- 3 que el salmón del atlántico, 800% más fósforo que la leche completa, 500% más calcio asimilable que la leche y 1400% más magnesio que el brócoli, entre otros beneficios”<sup>(8)</sup>.

## **2.2. ANTECEDENTES**

### **2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES**

**Jiménez P. Paula, Masson S. Lilia, Quitral R.Vilma. “Composición Química de Semillas de Chía, Linaza y Rosa Mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3”. Trabajo de investigación publicado en la Rev. Chil. de Nutrición. vol.40 N°.2. Santiago, Chile; 2013.**

El objetivo de este estudio publicado en la presente revista fue caracterizar las semillas oleaginosas: chía (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*), de acuerdo a la composición química y análisis de sus aceites. El contenido de grasa en las semillas se extrajo por Soxhlet, la composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquido (GLC), también se determinó el contenido de tocoles y estabilidad oxidativa<sup>(10)</sup>.

Los resultados respecto al contenido de materia grasa, los valores reportados por otros autores que se indica en este estudio fluctúan entre 30.0 y 33.5 g/100g, mientras que las muestras analizadas contienen un valor de 27.9 g/100g.

Las semillas vegetales analizadas se caracterizaron por su bajo contenido de humedad. En el caso de semillas de chía y linaza, además de tener un alto contenido de materia grasa, también contienen un aporte proteico importante. A diferencia de rosa mosqueta, que, a pesar de aportar menor cantidad de materia grasa y proteína en relación a las otras semillas en estudio, presentó un alto contenido de fibra dietética (64 g/100 g)<sup>(10)</sup>.

Los aceites de las tres semillas estudiadas se caracterizaron por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, destacando la presencia de los ácidos grasos esenciales (linoleico y linolénico), con un promedio entre ambos de un 70 % aproximadamente. Los aceites de las tres semillas contienen ácido oleico, siendo mayor en los aceites de rosa mosqueta (16,12 %) y linaza (15,76 %) que en chía. En los aceites de semilla de chía y linaza se identificó principalmente ácido linolénico (51.8 y 55.3 %, respectivamente), el aceite de rosa mosqueta en cambio presentó mayoritariamente ácido linoleico en su composición con 41.6 %, y el

ácido linolénico también está presente, aunque en menor proporción que en las semillas de chía y linaza, con un 27 %. De los aceites de las tres semillas, el de rosa mosqueta presenta un valor significativamente más alto de tocoferoles, siendo  $\gamma$ -tocotrienol el isómero más abundante en los aceites de las tres semillas estudiadas, lo que concuerda con lo descrito para otros aceites <sup>(10)</sup>.

**Ixtaina Vanesa Y. “Caracterización de la semilla y el aceite de chía (*Salvia hispánica L.*), obtenido mediante distintos procesos, aplicación en tecnología de alimentos”. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química- Argentina. Tesis Doctoral - 2010.**

El objetivo de este trabajo de Tesis es desarrollar el estudio de la caracterización de la semilla y de la obtención del aceite de chía, evaluando los distintos aspectos que inciden en su calidad global, así como investigar un mayor y mejor aprovechamiento y aplicación de sus componentes para la obtención de alimentos funcionales, benéficos para la salud del consumidor <sup>(11)</sup>.

El método utilizado fue mediante procesos convencionales (prensa, extracción por solventes) y a partir de nuevas tecnologías (extracción por fluidos supercríticos), en caso de la extracción por soxhlet se utiliza como solvente hexano y en el equipo de FSC se usa  $\text{CO}_2$  y se extrae el aceite de chía a diferentes presiones tiempo y temperatura, también se evalúan las principales características fisicoquímicas de los aceites obtenidos <sup>(11)</sup>.

El resultado en el porcentaje de rendimiento de la extracción del aceite de chía fue de 20.3-33.6 %, en cuanto a las características fisicoquímicas se determinó el índice de yodo obteniendo valores de 190.-215.0, índice de acidez 2.05, índice e saponificación 193.09-193.01, índice de refracción 1.4786-1.4781 e índice de peróxido 1.84+/-0.6-2.19+/-0.8, estos valores para el aceite de las semillas de chía de Argentina y Guatemala respectivamente. En la extracción por FSC, se llegó a la conclusión de que el tiempo y la presión de extracción tuvieron una gran influencia sobre el rendimiento del aceite, seguido de las interacciones presión-temperatura, presión- tiempo. Las condiciones operativas fueron 80 °C- 450 bar - 240 min, obteniéndose un rendimiento del aceite de 88.15%. El proceso de

obtención tiene efecto sobre el rendimiento del aceite, pero esta no influye significativamente en la composición de ácidos grasos <sup>(11)</sup>.

**Fernández Inés, Ayerza Ricardo, Coates Wayne. “Características nutricionales de la chía”. Universidad de Buenos Aires. Trabajo de investigación publicado en la revista de actualización en nutrición vol. 7, N° 1. Buenos Aires- Argentina; 2006.**

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la administración de semillas o aceite de chía sobre el perfil de lípidos séricos en modelo experimental de rata. Se utilizó ratas de la cepa wistar (n=18, 6 ratas por grupo), recibiendo dietas experimentales al 20% de proteínas durante 30 días. El grupo experimental CH recibió dieta conteniendo 15% de semillas enteras de chía completando con caseína para llegar al 20% de proteínas; el grupo A recibió caseína como fuente proteica y aceite de chía en una cantidad igual a la aportada por el 15% de las semillas de chía; el grupo control recibió solo dieta de caseína al 20% de proteína. Al finalizar el periodo experimental se extrajo sangre por punción venosa, determinándose en el suero por métodos enzimáticos: colesterol total, triglicéridos y las fracciones HDL y LDL colesterol <sup>(12)</sup>.

Las concentraciones de colesterol se encontraron significativamente disminuidas en el grupo CH con respecto a control C (95.88 vs 108.11), los triglicéridos se presentan significativamente disminuidos en ambos grupos (CH: 69.67, A: 82.50, C: 206.83), la fracción HDL se encuentra aumentada en CH y A. (CH: 31.92, A: 39.56, C: 26.19) y no se encontraron diferencias en los valores de LDL entre los grupos <sup>(12)</sup>.

### **2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES**

**Ibañez Vasquez Llucy y Colaboradores. “Evaluación de la Toxicidad Aguda y la Acción Hipolipemiente del Aceite de *Plukenetia Volubilis*, Sacha Inchi”. Universidad de san Martín de Porres. Trabajo de investigación publicado en Revista Horizonte Medico, vol. 6 N°1, Lima- Perú; 2006.**

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la toxicidad aguda del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (Sacha Inchi) y su efecto hipolipemiente en los valores del colesterol total, HDL y triglicéridos <sup>(13)</sup>.



Se determinó la dosis letal-50 (DL50) en 42 ratones de la cepa Nish, distribuidos en siete grupos de seis ratones cada uno, a los cuales se le administró, vía oral, dosis crecientes del aceite (2, 4, 8, 16, 32, 64, 96 y 128 ml/kg). Para evaluar el efecto hipolipemiente se utilizó 55 ratas albinas machos de la raza holtzman, en un peso entre 194g y 290 g y dos meses de edad. Se utilizó una dieta con 15 % de grasa saturadas para elevar los lípidos séricos durante todo el tiempo del experimento <sup>(14)</sup>.

Se utilizó tres dosis diferentes de Sacha Inchi (0.5, 1 y 2 ml/kg), administradas durante 14 días consecutivos, comparando sus efectos con un control positivo (lovastatina) y un control negativo (sol. Fisiológica), se controló el peso de los animales y los valores del colesterol total, HDL, LDL-colesterol y triglicéridos sanguíneos en tres tiempos diferentes <sup>(13)</sup>.

Los resultados fueron, la DL50 fue de 111,65 mg/kg; hubo una reducción significativa de los valores sanguíneos de triglicéridos y LDL, mas no de colesterol y peso de los animales <sup>(13)</sup>.

En conclusión, el aceite de Sacha Inchi es prácticamente inocuo en ratones, administrado por vía oral, también tiene un efecto hipolipemiente reduciendo los valores séricos de triglicéridos y LDL-colesterol, mas no del colesterol total <sup>(13)</sup>.

### **2.2.3. ANTECEDENTES LOCALES**

No se encontraron antecedentes locales.

### **2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN**

En nuestro país, no se encontró antecedentes propios de *Salvia hispania L.* (Chía), por ello se consultaron trabajos científicos internacionales relacionados con la especie y con el tema de investigación. Se encontró el estudio de la composición química de las semillas de chía por Ixtaina (2010) <sup>(11)</sup> y Jiménez (2013) <sup>(10)</sup>, de Argentina y Chile respectivamente, como también sobre las características nutricionales de la chía de Fernández (2006) <sup>(12)</sup>, de Argentina, también se encontró un antecedente nacional que fue un trabajo de investigación sobre el efecto hipolipemiente del aceite de Sacha Inchi estudiada por Ibañez (2006) <sup>(13)</sup>. En nuestra escuela profesional de Farmacia y Bioquímica y la escuela profesional de Biología de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco, no se encontraron antecedentes con especies oleaginosas. En nuestra escuela

profesional de Farmacia y Bioquímica solo se encontró trabajos de investigación del efecto hipolipemiente de extractos etanólicos de diferentes plantas, mas no de aceites.

Las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), es muy utilizada por sus propiedades nutricionales, adelgazantes y medicinales, pero no están estudiadas farmacológicamente sino solo nutricionalmente, por esta razón no se encontraron antecedentes sobre el efecto hipolipemiente, por lo cual se necesita investigarse el aceite de chía, pues aporta diferentes propiedades a la de las semillas y así este estudio pueda contribuir en la salud de forma confiable y segura.

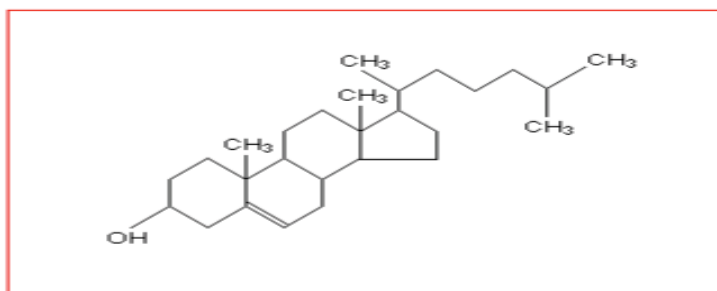
## 2.4. BASES TEÓRICAS

### 2.4.1. COLESTEROL

El colesterol es un compuesto alicíclico cuya estructura comprende, el núcleo de perhidrociclopentanofenantreno con sus cuatro anillos fusionados, un solo grupo hidroxilo en la posición c-3, un centro insaturado entre los átomos de carbono 5 y 6, una cadena hidrocarbonada ramificada de ocho carbonos y unida al anillo en la posición 17 y un grupo metilo unido a la posición 10 y otro grupo metilo unido a la posición 13 <sup>(14)</sup>.

El colesterol es un lípido muy poco soluble en agua. La concentración de colesterol en el plasma de individuos sanos es normalmente de 150-200mg/100ml. La elevada solubilidad del colesterol en la sangre se debe a la presencia de las lipoproteínas plasmáticas (principalmente LDL y VLDL), que tienen la capacidad de fijar por tanto solubilizar grandes cantidades de colesterol <sup>(14)</sup>.

FIGURA 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DEL COLESTEROL.



Fuente: (Devlin, 2004) <sup>(14)</sup>.

### **2.4.1.1. IMPORTANCIA:**

El colesterol, que puede provenir de la dieta o de la síntesis de novo en prácticamente todas las células humanas, juega varios papeles importantes. Es el esteroide mayoritario en el hombre, y es un componente de virtualmente todas las membranas plasmáticas e intracelulares. El colesterol es particularmente abundante en las estructuras mielinizadas del cerebro y del sistema nervioso central, pero está también presente en pequeñas cantidades en la membrana interna de la mitocondria. A diferencia de lo que ocurre en el plasma, la mayor parte del colesterol de las membranas celulares se encuentra en forma libre, no esterificado <sup>(14)</sup>.

El colesterol es el precursor inmediato de los ácidos biliares que se sintetizan en el hígado y que actúan facilitando la absorción de los triacilglicéridos y vitaminas liposolubles de la dieta <sup>(14)</sup>.

También es precursor de diversas hormonas esteroideas. La progesterona secretada por el cuerpo lúteo del ovario y por la placenta. Los corticoesteroides provienen del colesterol; entre ellos se cuentan la desoxicorticosterona, cortisol y cortisona. El mineralocorticoide aldosterona se obtiene del colesterol en la zona glomerulosa del córtex de la glándula adrenal. El colesterol sirve de precursor de las hormonas esteroideas femeninas, (los estrógenos por ejm. estradiol), en el ovario y esteroideas masculinos (por ejm. testosterona), en los testículos <sup>(14)</sup>.

### **2.4.1.2. SÍNTESIS**

La ruta de síntesis del colesterol tiene lugar en el citosol y en el retículo endoplasmático, y es impulsada en gran parte por la hidrólisis de los enlaces tioéster de alta energía del acetil CoA y los enlaces fosfoanhidrido del ATP <sup>(15)</sup>.

El acetil-CoA se encuentra en la mitocondria, por lo que debe salir de ella en forma de citrato al citosol <sup>(14)</sup>.

Las unidades isoprenoideas serán las piezas que van a condensarse para dar lugar a cadenas hidrocarbonadas muy largas que se ciclarán y originarán a los metabolitos previos al colesterol, al geranil pirofosfato se le une el isopenil pirofosfato para dar lugar a un compuesto de 15 carbonos, el farnesil fosfato, la

unión de dos farnesiles pirofosfatos originaran al escualeno (30 carbonos) aun a una molecula lineal, para la formación del escualeno hace falta la formación de un epóxido que se origina entre los carbonos 3' y 4', este es el paso previo para que se pueda ciclar la molécula, la ciclación la lleva acabo la epóxido escualeno ciclasa, así que la primera molécula ciclada, el lanosterol y finalmente existe 20 pasos reaccionales desde la formación del lanosterol hasta que se llega a la formación del colesterol <sup>(14)</sup>.

LANOSTERO → ZIMOSTEROL → DESMOSTEROL →→→ COLESTEROL

La estructura (lanosterol) sufre una serie de reacciones, unos pequeños cambios, algunos de los cuales no se conoce como se dan, la modificación de la molecular pasa por: cambios de dobles enlaces, perdida de metilos, perdida de doble enlaces del carbono 25 y al final todos estos cambios queda constituido el colesterol de 27 carbonos <sup>(14)</sup>.

#### **2.4.1.3. REGULACIÓN METABÓLICA**

El colesterol sigue una regulación muy estricta, así mismo se debe de tener en cuenta que dan origen al colesterol y el mecanismo que provocan su desaparición <sup>(14)</sup>.

- La HMG – CoA reductasa, se controla por el producto de su reacción si queremos cambiar la concentración del colesterol se puede actuar sobre esta enzima, este control se puede realizar controlando la cantidad de enzima. A menor cantidad menor actividad y a la inversa, también controlando su actividad: mediante factores alostericos como fármacos entre otros y aumentando la síntesis de la HMG – CoA reductasa <sup>(14)</sup>.
- Regulación de su cantidad, aumentando su expresión genética podemos aumentar la degradación del colesterol y si la disminuimos, se disminuye la cantidad del colesterol; para aumentar la síntesis de HMG – CoA reductasa se administrará insulina o hormonas tiroideas y para aumentar la síntesis de HMG – CoA reductasa se aumentara la concentración de colesterol (que actúa sobre factores transcriptores), o también se puede aumentar el ácido mevalónico (que significa lo mismo que aumentar el colesterol) o sino aumentar la concentración de glucagón y corticosteroides: Existen otros

mecanismos de control de la síntesis de la HMG – CoA reductasa, pero estos son los más importantes <sup>(14)</sup>.

### **2.4.2. LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

Los lípidos sanguíneos se mantienen en solución, o al menos muy dispersado en la circulación, gracias a que están incorporados a estructuras macromoleculares denominadas lipoproteínas. Las lipoproteínas plasmáticas facilitan el metabolismo lipídico y la transferencia de lípidos entre tejidos. Existen cuatro clases principales de lipoproteínas: lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones <sup>(14)</sup>.

Las lipoproteínas plasmáticas constituyen el vehículo mediante el cual se transportan el colesterol, los ésteres de colesterol y los triacilglicerol de un tejido u órgano a otro en el cuerpo. La LDL lleva el colesterol a diversos tejidos que requieren colesterol para la estructura membranar o para la síntesis de hormonas esteroideas <sup>(14)</sup>.

Por el contrario, la HDL, que es rica en colesterol y tiene un contenido de triacilglicerol bajo, constituye el vehículo principal para el transporte del exceso de colesterol desde la periferia al hígado en donde se puede excretar a través de la bilis ya sea directamente en forma de colesterol o después de su conversión en ácidos biliares. Las lipoproteínas especialmente la de VLDL y los quilomicrones, transportan triacilglicerol a los sitios en que son metabolizados para la producción de energía o para su almacenamiento <sup>(14)</sup>.

### **2.4.3. TRIGLICÉRIDOS**

Los triglicéridos es la combinación de tres ácidos grasos condensados en una molécula de glicerol. Los triglicéridos se sintetizan en la mayoría de los tejidos a partir de ácidos grasos activados y de un producto del catabolismo de la glucosa, que puede ser el glicerol 3-fosfato o la dihidroxiacetona fosfato <sup>(16)</sup>.

El lugar de acumulación de triglicéridos es el citoplasma de las células adiposas, estas están especializadas en la síntesis y almacenamiento de triglicéridos y en su movilización <sup>(15)</sup>.

## **2.4.4. HIPERLIPIDEMIAS**

### **2.4.4.1. DEFINICIÓN**

Hiperlipidemia, aumento de la concentración plasmática de lipoproteínas circulantes <sup>(17)</sup>.

También es posible clasificar las hiperlipidemias en primarias estas cuando se produce una alteración genética determinadas, como la hipercolesterolemia familiar, secundarias cuando se produce como consecuencia a otros procesos patológicos (alcoholismo, diabetes, obesidad, hipotiroidismo, insuficiencia renal crónica, hepatopatías), una ingesta dietética muy rica en colesterol y triglicéridos o a la administración de fármacos (tiazidas, B -bloqueantes, estrógenos, anticonceptivos orales , glucocorticoides) <sup>(5)</sup>.

Los resultados de los ensayos clínicos controlados de prevención primaria y secundaria han permitido establecer que los niveles plasmáticos son:

- Colesterol total: < 200mg/dl.
- LDL colesterol: < 130mg/dl.
- Triglicéridos: < 150mg/dl.
- HDL colesterol: > 45mg/dl.

En los estudios de prevención primaria se incluyen tanto factores de riesgo no modificables (edad, antecedentes familiares de cardiopatía isquémica) como modificables (tabaquismo, hipertensión arterial, niveles de HDL < 40mg/dl, y obesidad abdominal) por el contrario, en la prevención secundaria los factores de riesgo incluyen los antecedentes personales de enfermedad cardiovascular (presencia de cardiopatía isquémica, accidente cerebro vasculares, arteriopatía periférica o aneurisma aórtico) <sup>(5)</sup>.

### **2.4.4.2. TRATAMIENTO**

- El tratamiento comprende la dieta, corrección de los factores de riesgo y tratamiento farmacológico.
- Tratamiento dietético, consiste en reducir la ingesta de grasas con una dieta hipocalórica y elevar el gasto energético mediante el incremento del ejercicio físico <sup>(5)</sup>.

- Corrección de los factores de riesgo, implica identificar y controlar los factores de riesgo, sedentarismo, consumo de alcohol, obesidad, estrés, hipertensión arterial o diabetes.
- Tratamiento farmacológico, mediante fármacos que disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol, bien por inhibir su síntesis hepática o por disminuir su absorción digestiva (resinas ezetiniba), o disminuye los niveles de triglicéridos por aumentar su metabolismo el de las VLDL (fibratos, ácido nicotínico) <sup>(5)</sup>.

CUADRO 1: RESUMEN DE LOS FÁRMACOS HIPOLIPEMIANTES

FÁRMACOS HIPOLIPEMIANTES	MECANISMO DE ACCIÓN	REACCIONES ADVERSAS	EJEMPLOS
<b>Estatinas</b>	Reducen la síntesis celular del colesterol y los niveles circulantes de LDL-colesterol, las células responden a esta reducción aumentando la expresión, particularmente en el hígado, de los genes que codifican la HMG-CoA-reductasa, por lo que la síntesis de colesterol disminuye solo ligeramente, y los receptores celulares de las LDL, aumentando la captación hepática LDL y VLDL <sup>(5)</sup> .	Dispepsia, náuseas, flatulencias Cefaleas, dificultad para dormir y concentrarse, enrojecimiento cutáneo. Las reacciones más graves pueden ser miopatías, mialgia, debilidad y fatiga muscular <sup>(5)</sup> .	Fluastatina Pravastatina Lovastatina Sinvastatina Atorvastatina <sup>(5)</sup> .
<b>Resinas de intercambio iónico</b>	En el intestino delgado se unen a los ácidos biliares formándose complejos resina-ácidos biliares, que no se absorben como consecuencia inhiben la circulación entero hepática de los ácidos biliares y la absorción digestiva del colesterol. Las resinas disminuyen los ácidos biliares y estimulan la conversión del colesterol endógeno en ácidos biliares que se eliminan por vía biliar, un efecto que disminuye el contenido hepático de colesterol <sup>(5)</sup> .	Náuseas, vómitos, distensión abdominal, meteorismo. A dosis altas producen esteatorrea y disminuyen la absorción de vitaminas liposolubles (A; D y K) <sup>(5)</sup> .	Colestiramina Colestipol Filicol <sup>(5)</sup>

<b>Fibratos</b>	Agonistas de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas PPAR. La unión de los fibratos a los PPAR alfa aumenta la actividad de las enzimas implicadas en la beta oxidación mitocondrial de los ácidos grasos en el hígado y en el musculo esquelético, disminuyéndola síntesis de triglicéridos y la secreción hepática de VLDL y también aumentan los niveles de HDL colesterol <sup>(5)</sup> .	Náuseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal, flatulencias, coleditiasis, prurito, exantemas, urticaria, alopecia, anemia, leucopenia, cefaleas. Etc <sup>(5)</sup> .	Clofibratos Genfibrozilo Fenofibrato Alufibratos Binifibratos Bezafibratos Ciclifibratos Etofibratos <sup>(5)</sup> .
<b>FARMACOS HIPOLIPEMIANTES</b>	<b>MECANISMO DE ACCIÓN</b>	<b>REACCIONES ADVERSAS</b>	<b>EJEMPLOS</b>
<b>Ácido nicotínico</b>	Su mecanismo no es bien conocido. En el hígado, reduce la síntesis de triglicéridos en (25 – 35%), y estimula el aclaramiento de los triglicéridos de los quilomicrones y de las VLDL. Disminuye los niveles de VLDL (25 – 40%) y de LDL (15 – 30%) y aumenta los HDL (15 – 30%) <sup>(5)</sup> .	Náuseas, dolor gástrico, diarreas, vómitos enrojecimiento, prurito, exantemas, hiperuricemia y taquicardia <sup>(5)</sup> .	Acido nicotínico <sup>(5)</sup> .

**Fuente:** Elaboración propia.

### 2.4.5. CHÍA

La *Salvia hispánica L. (Chía)*, es una especie es originaria de áreas montañosas de México y si bien resulta una verdadera novedad en nuestro mercado, se sabe que hace ya 3500 años a.c. era conocida como un importante alimento y medicina. En la época precolombina era para los mayas uno de los cuatro cultivos básicos destinados a su alimentación, junto al maíz, el poroto y el amaranto. Con el paso del tiempo su uso cayó en el olvido y fue a finales del siglo pasado que el interés por la chía resurgió, ya que se la puede considerar una buena fuente de fibra dietaría, proteína y antioxidantes. En el año 1991 se reconocieron sus propiedades y fue reactivado su cultivo gracias a un programa de desarrollo e investigación de la Universidad de Arizona, promoviendo la recuperación de este cultivo subtropical en EEUU, México y Argentina <sup>(2)</sup>.



La *Salvia hispánica* L. es comúnmente conocida como chía, siendo esta palabra una adaptación española al término nahua chían o chien (plural), término que en náhuatl significa “semilla de la que se obtiene aceite” <sup>(18)</sup>.

En el imperio azteca. La Chía era su alimento, medicina y como base para sus pinturas corporales, con fines decorativos y ofrenda a los dioses <sup>(19)</sup>.

*FIGURA 2: LA PLANTA DE Salvia hispánica L. (CHÍA).*



**Fuente:** Revista Agro mensajes <sup>(2)</sup>.

*FIGURA 3: SEMILLAS DE Salvia hispánica L. (CHÍA)*



**Fuente:** (USDA, 2010) <sup>(19)</sup>.

### 2.4.5.1. UBICACIÓN SISTEMÁTICA

Según la clasificación taxonómica propuesta por CARLOS Linneo, la posición sistemática de la *Salvia hispánica* L. (chía) es la siguiente:

**Reino:** Vegetal o Plantae

**División:** Magnoliophyta o Angiospermae

**Clase:** Magnoliopsida o Dicotyledoneae

**Orden:** Lamiales

**Familia:** Lamiaceae

**Subfamilia:** Nepetoideae

**Tribu:** Mentheae

**Género:** *Salvia*

**Especie:** hispánica

### 2.4.5.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

La *salvia hispánica* L. es una planta herbácea anual; tiene de hasta 1 m de altura que presenta hojas opuestas de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 cm de ancho. Las flores son hermafroditas, entre purpúreas y blancas, y brotan en ramilletes terminales. La planta florece entre julio y agosto en el hemisferio norte; al cabo del verano, las flores dan lugar a un fruto en forma de aqueno indehisciente cuya semilla es rica en mucílago, fécula y aceite; tiene unos 2 mm de largo por 1,5 de ancho, y es ovalada y lustrosa, de color pardo-grisáceo a rojizo <sup>(7)</sup>.

### 2.4.5.3. VALOR NUTRICIONAL DE *Salvia hispánica* L. (chía)

TABLA 1: VALOR NUTRICIONAL DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (CHÍA)

Carbohidratos	42.12
Fibra alimentaria	34.4
Grasas	30.74
Proteínas	16.54
Agua	5.80
Retinol	54 µg (6%)

Tiamina	0.620 mg (48%)
Riboflavina	0.170 mg (11%)
Niacina	8.830 mg (59%)
Vitamina c	1.6 mg (3%)
Vitamina e	0.50 mg (3%)
Calcio	631 mg (63%)
Hierro	7.72 mg (62%)
Magnesio	335 mg (91%)
Fosforo	860 mg (123%)
Potasio	407 mg (9%)
Sodio	16 mg (1%)
Zinc	4.58 mg (46%)

Valor nutricional por cada 100 g / Energía 483 kcal 2017 kJ

Fuente: (USDA, 2010)<sup>(19)</sup>.

#### 2.4.5.4. PROPIEDADES DE *Salvia hispánica L.* (chía).

Las semillas de chía representan la fuente vegetal con más alta concentración de Omega 3. Poseen un 33 % de aceite, del cual el ácido linolénico representa el 62 % y el linoleico el 20 %. La chía es el cultivo con mayor porcentaje de AGE al tener el 82 % de sus lípidos con dicha característica. Más allá de su excelente perfil lipídico, la chía tiene buena dosis de proteína (23 %), aminoácidos esenciales, entre ellos la lisina, limitante en los cereales. En materia de vitaminas, es una buena fuente del grupo B. La carencia de vitamina B favorece la formación de depósitos de placas en las paredes arteriales e incrementa el riesgo de afecciones cardiovasculares. Pero los minerales que la chía vuelve a destacarse pues posee 714 mg de Ca en la semilla entera y 1180 mg en las semillas parcialmente desgrasadas (harina); para dar una idea, la leche tiene apenas 125 mg, o sea entre 6 y 10 veces menos. Además, posee gran riqueza en hierro (16,4 mg), magnesio (390 mg), potasio (700 mg) y fósforo (1.057 mg). La chía también contiene buenos valores de cinc y manganeso, siendo muy pobre en sodio. Otra virtud de la chía es su buena cantidad (27 %) y calidad de fibra, sobre todo en forma de fibra soluble (mucílagos). Este tipo de fibra retarda el índice de glucosa en sangre y reduce la absorción de colesterol <sup>(2)</sup>.

Las Propiedades terapéuticas de las semillas de chía aportan los siguientes efectos: antioxidante, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio, anticarcinogénico, laxante, hipotensor, hipocolesterolemizante, hipoglucemizante, inmuno-estimulante, tónico cardíaco y nervioso, y alimento mineralizante, vitamínico y proteico. El consumo de chía resulta útil en casos de celiaquía, depresión, estrés, diabetes, obesidad, problemas gastrointestinales, tumores, artritis, asma, afecciones cardiovasculares y pulmonares, soriasis, arteriosclerosis, anemias, embarazo, lactancia, crecimiento y debilidad inmunológica <sup>(2)</sup>.

Como contraindicaciones y efectos secundarios al consumir semillas de chía se debe prestar especial atención a aquellos usuarios medicados contra la hipertensión o cuya tensión tienda a ser baja, puesto que esta semilla tiene la propiedad de reducir la presión sanguínea por su efecto vasodilatador. En determinadas personas, el consumo de chía puede ocasionar dolor de estómago. Asimismo, las personas que padecen diverticulitis deberían no tomar las semillas, pues podría agravarse la inflamación, también en casos de diarreas <sup>(58)</sup>.

Dentro de los efectos adversos podemos decir que según varias personas que consumieron las semillas de chía por bastante tiempo, mencionaron que tuvieron una disminución de la vista, sin embargo no hay investigaciones sobre estos efectos adversos de la chía.

#### **2.4.5.5. ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (chía)**

El contenido de aceite presente en la semilla de chía es de alrededor de 33%, el cual presenta el mayor porcentaje de ácido  $\alpha$ -linolénico conocido hasta el momento (62 – 64 %) <sup>(18)</sup>.

Dado su alto contenido de Omega-3, bastaría con ingerir apenas unos gramos de aceite (una cucharadita) en crudo, a fin de cubrir las necesidades diarias de ácido linolénico <sup>(18)</sup>. El aceite obtenido de la semilla de chía no tiene ni produce olor a pescado <sup>(18)</sup>, por lo que el consumo de los productos obtenidos o realizados con la semilla de chía no necesitan un empaque y condiciones de almacenamiento especiales para prevenir incluso los menores cambios ocasionados por el medio ambiente haciendo que los antioxidantes naturales sustituyan el uso de estabilizadores artificiales; haciendo de éste, un cultivo sustentable y ecológico y

convirtiendo a la semilla o cualquiera de sus derivados en materia prima ideal para enriquecer una gran diversidad de productos, gracias a su composición química y su valor nutricional, confiriéndole un gran potencial para usarla dentro de los mercados alimenticios <sup>(2)</sup>.

El consumo de aceite de chía: se puede incluir en aceites y grasas hasta un 10% y como complemento nutricional se pueden consumir hasta 2 g de aceite de chía al día <sup>(59)</sup>.

En cuanto a las contraindicaciones y efectos adversos del aceite de chía no se encontraron investigaciones que reporten algún efecto no deseado.

**TABLA 2: CANTIDAD EN PORCENTAJE DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (CHÍA) EN LOS DIFERENTES PAÍSES DE AMÉRICA DEL SUR.**

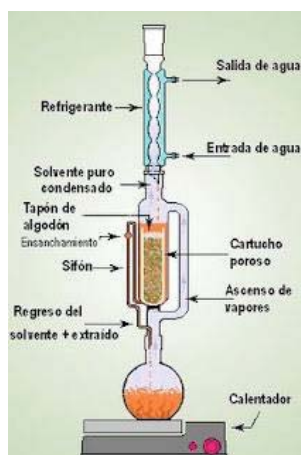
País	Aceite(g/100g de semilla)	Ácido graso (%)				
		Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	α-Linolenico
Argentina	34.0	7.0	3.0	6.7	19.5	63.1
Bolivia	32.7	7.4	2.7	7.1	18.7	63.6
Colombia	29.9	7.5	3.5	7.6	19.2	57.9
México	31.0	6.7	3.3	7.5	19.6	61.6

Fuente:(Ayerza, 2006) <sup>(18)</sup>.

#### 2.4.6. EXTRACCIÓN DE ACEITES POR EL MÉTODO DE SOXHLET

Es un método utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, a través de un disolvente afín. Consiste en colocar el material a extraer previamente molido y pesado, en un cartucho de celulosa que se introduce en la cámara de extracción, conectada por una parte a un balón de destilación y por otra parte a un refrigerante. El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición, el vapor haciendo por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material. Cuando alcanza el nivel conveniente sifonea por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material <sup>(20)</sup>.

FIGURA 4: EQUIPO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES SOXHLET



Fuente: (Núñez, 2008) <sup>(21)</sup>

#### 2.4.7. EXTRACCIÓN DE ACEITES POR EL EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

El principio de extracción se basa en que el fluido es llevado a un estado supercrítico específico a fin de extraer un soluto determinado. Así, el material a ser sometido al proceso es expuesto al fluido bajo condiciones de tiempo, temperatura y presión controladas, lo que permite la disolución de los solutos de interés en el fluido supercrítico. El soluto disuelto es separado posteriormente del fluido supercrítico mediante la disminución de la presión de la solución <sup>(22)</sup>. La manipulación de la temperatura y presión por encima del punto crítico modifica las propiedades del fluido y mejora su habilidad para penetrar en las estructuras y extraer determinadas moléculas de diferentes tipos de materiales <sup>(22)</sup>.

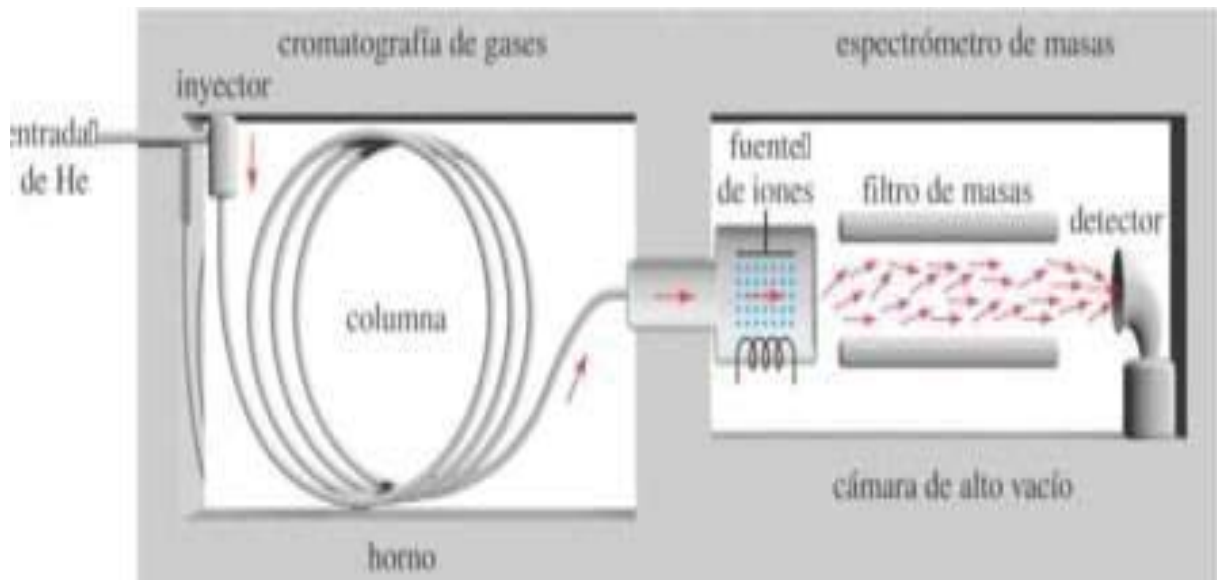
Dentro de los solventes utilizados en este método se pueden mencionar al etileno, dióxido de carbono, etano, propano, *n*-hexano, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, agua, entre otros. El dióxido de carbono es el fluido supercrítico más comúnmente utilizado para la extracción de productos alimenticios ya que presenta una serie de ventajas: es de bajo costo, se comercializa en un grado de alta pureza, no contamina el ambiente, no es tóxico ni inflamable, es fácilmente removible del producto de interés a través de una simple despresurización una vez finalizada la extracción y resulta ideal para extraer compuestos termosensibles ( $T_c$  31,1°C,  $P_c$  73,8 bar). Además, el dióxido de carbono en estado supercrítico (SC – CO<sub>2</sub>) presenta una alta densidad y baja viscosidad, lo cual aumenta su capacidad para solubilizar compuestos y permite una mejor penetración hacia el interior de los sólidos <sup>(22)</sup>.

## 2.4.8. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente <sup>(23)</sup>.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual. En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas <sup>(23)</sup>.

FIGURA 5: CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.



Fuente: (Estremera, 2011) <sup>(24)</sup>

#### 2.4.9. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE LA DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL TOTAL, LDL-COLESTEROL, HDL-COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS.

El fundamento del método enzimático colorimétrico de la determinación del colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos, que se determinó en el espectrofotómetro UV visible, se observa en el Anexo N° 8, 9, 10 y 11.

#### 2.4.10. FUNDAMENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ABSORCIÓN APARENTE DEL ACEITE DE CHIA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Las grasas es el nutriente que menos se afecta en la absorción. Así mientras la absorción de las proteínas y carbohidratos disminuyen más en casos de diarreas, las grasas por poseer una elevada densidad energética 9kcal/g no son afectadas. Sin embargo un elemento a considerar, en relación con esta proposición, es la influencia del tipo de grasa en su biodisponibilidad. En el individuo sano los mecanismos de absorción no están afectados y la absorción de todo tipo de grasa



independientemente de su procedencia es superior al 90 %. Sin embargo es conocido que el mecanismo de absorción de las grasas difiere según las características de los ácidos grasos constituyentes. Así una fuente de grasa, que presente una mayor proporción de ácidos grasos de cadena corta y media pudiera ser mejor absorbida y de esta manera suministrar mayor cantidad de energía al organismo. <sup>(41)</sup>

#### **2.4.11. FUNDAMENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL ACEITE DE CHÍA EN EL ESTÓMAGO E INTESTINO DELGADO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Los fosfolípidos microbianos y los ácidos grasos procesados son digeridos y absorbidos a través de la pared del intestino. La bilis secretada por el hígado y las secreciones pancreáticas (ricas en enzimas y en especial las lipasas pancreáticas y bicarbonato) se mezclan con el contenido del intestino delgado. Las secreciones biliares en especial el ácido glicólico, taurocólico y cólico son esenciales para preparar los lípidos para la absorción, formando partículas mezclables con agua que pueden entrar en las células intestinales. En las células intestinales la mayor parte de los ácidos grasos se ligan con glicerol (proveniente de la glucosa de la sangre) para formar triglicéridos. Para determinar su presencia en el intestino se pueden realizar mediante el uso del microscopio. <sup>(42)</sup>

Los triglicéridos, algunos ácidos grasos libres, colesterol y otras sustancias relacionadas con lípidos se recubren con proteínas para formar lipoproteínas ricas en triglicéridos, también llamados lipoproteínas de baja densidad. Las lipoproteínas ricas en triglicéridos entran en los vasos linfáticos y de allí pasan al canal torácico (donde el sistema linfático se conecta con la sangre), y así llegan a la sangre. En contraste en la mayoría de nutrientes absorbidos en tracto gastrointestinal los lípidos absorbidos no van al hígado sino que entran directamente a la circulación general. Así los lípidos absorbidos pueden ser utilizados por todos los tejidos del cuerpo sin ser procesados por el hígado. <sup>(41)</sup>

#### **2.4.12. FUNDAMENTO PARA DETERMINAR LA INFLUENCIA DEL pH DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, EN LA EMULSIÓN DEL ACEITE DE CHÍA**

Los ácidos grasos de cadena larga necesitan ser solubilizados en los contenidos del intestino a través de una mezcla de sales biliares para su posterior absorción y no poseen ninguna influencia frente al pH. Por el contrario los ácidos grasos de cadena corta al ser monómeros en la fase acuosa luminal pueden ser absorbidos por cualquier segmento del tracto digestivo de los mamíferos. Como regla general los compuestos hidrosolubles no ionizados pasan a través de la membrana celular lipídica pero sus partes ionizadas no lo hacen al igual ocurren con los ácidos grasos. <sup>(44)</sup>

El índice de absorción relativa de un electrolito débil depende no solo de la liposolubilidad relativa del compuesto no ionizado sino que también lo hace de su  $pK$ . La  $pK$  de los ácidos grasos es cercana a 4.8 y los grados de ionización del ácido aumentan con el pH y es aproximadamente 100/1 con un pH de 7.0. En condiciones fisiológicas normales, el pH de los contenidos del canal alimentario es mayor que 5.0 a excepción del estómago e incluso algunas veces más alto que 7.0, es posible que los ácidos grasos puedan ser absorbidos incluso en un pH neutro. <sup>(44)</sup>

El transporte de ácidos grasos parece ser principalmente debido a una difusión pasiva no iónica. Quizá pueda ser considerado como una especie de “transporte activo” ya que se requiere energía para los mecanismos de regulación del pH. <sup>(44)</sup>

#### **2.4.13. FUNDAMENTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS LÍPIDOS**

La hidrólisis enzimática se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas, estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, es decir producen la ruptura de enlaces por agua según  $H-OH+R-R \rightarrow R-H+R-OH$ . En algunos casos este grupo puede ser transferido por la enzima a otras moléculas y se consideran la hidrólisis misma como una transferencia del grupo agua. Estas enzimas que catalizan de forma natural la hidrólisis de triacilglicéridos, están presentes en la totalidad de los organismos vivos desde los microorganismos a los animales superiores, siendo imprescindible para la asimilación de los lípidos así como también para su almacenamiento y posterior utilización de las grasas que sirven de reserva energética. <sup>(43)</sup>

#### 2.4.14. DEFINICIÓN DE TERMINOS

1. **HIPOLIPEMIANTE:** Fármaco que reduce los niveles de Colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos <sup>(25)</sup>.
2. **ESTATINAS:** son fármacos conocidas también como inhibidores de la reductasa de la coenzima a 3-hidroxi-3-metilglutaril (Coa-HMG) están aprobadas para el tratamiento de las hiperlipidemias <sup>(25)</sup>.
3. **HIPERLIPEDEMIA:** Cantidad excesiva de lípidos en plasma sanguíneo <sup>(26)</sup>.
4. **EXTRACTOR SOXHLET:** El extractor Soxhlet o simplemente Soxhlet (en honor a su inventor Franz von Soxhlet) es un tipo de material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, a través de un disolvente afín <sup>(26)</sup>.
5. **ACEITE CRUDO:** La grasa cruda en los alimentos es el residuo no volátil que queda después de evaporar en estufa el extracto obtenido por la acción del éter sobre el alimento <sup>(25)</sup>.
6. **HDL-COLESTEROL:** - (High Density Lipoproteins), lipoproteínas de alta densidad <sup>(25)</sup>.
7. **LDL-COLESTEROL:** (Low Density Lipoproteins), lipoproteínas de baja densidad <sup>(25)</sup>.
8. **VLDL-COLESTEROL:** (Very Low Density Lipoproteins), lipoproteínas de muy baja densidad <sup>(25)</sup>.
9. **OMEGA-3:** Son ácidos grasos esenciales poliinsaturados (el organismo humano no los puede fabricar a partir de otras sustancias), que se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados (por regla general pescado azul), y en algunas fuentes vegetales como el aceite de perilla, las semillas de lino, la semilla de chía, el Sacha Inchi, etc Inicialmente se les denominó vitamina F hasta que determinaciones analíticas más precisas hicieron ver que realmente formaban parte de los ácidos grasos. Algunas fuentes de omega 3 pueden contener otros ácidos grasos como el omega 6 <sup>(25)</sup>.
10. **OMEGA-6:** Son un tipo de ácido graso comúnmente encontrados en los alimentos grasos o la piel de animales. Estudios recientes han encontrado que niveles excesivos de omega-6, comparado con omega-3, incrementan el riesgo de contraer diferentes enfermedades, incluyendo depresión <sup>(25)</sup>.

11. **ARTERIOSCLEROSIS:** La aterosclerosis es una enfermedad en la que la placa se deposita dentro de las arterias. Las arterias son vasos sanguíneos que llevan sangre rica en oxígeno al corazón y a otras partes del cuerpo. La placa está compuesta por grasas, colesterol, calcio y otras sustancias que se encuentran en la sangre. Con el tiempo, la placa se endurece y estrecha las arterias, con lo cual se limita el flujo de sangre rica en oxígeno a los órganos y a otras partes del cuerpo <sup>(25)</sup>.
12. **CARDIOPATIA ISQUEMICA:** La cardiopatía isquémica es una designación genérica para un conjunto de trastornos íntimamente relacionados, en donde hay un desequilibrio entre el suministro de oxígeno y sustratos con la demanda cardíaca. La isquemia es debida a una obstrucción del riego arterial al músculo cardíaco y causa, además de hipoxemia, un déficit de sustratos necesarios para la producción de ATP y un acúmulo anormal de productos de desecho del metabolismo celular <sup>(25)</sup>.
- El estrechamiento de las arterias coronarias que irrigan el corazón ocurre fundamentalmente por la proliferación de músculo liso y el depósito irreversible de lípidos, especialmente ésteres y cristales de colesterol. La lesión principal sobre el interior de los vasos sanguíneos del corazón se denomina placa de ateroma, rodeada por una capa de fibrosis <sup>(25)</sup>.
13. **GRASAS TRANS:** Las grasas trans son un tipo de grasa que se forma cuando el aceite líquido se transforma en una grasa sólida añadiendo hidrógenos. Este proceso se llama hidrogenación y sirve para incrementar el tiempo de vida útil de los alimentos <sup>(25)</sup>.
14. **GRASAS POLIINSATURADAS:** Los ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos. Dentro de este grupo encontramos el ácido linolénico (omega 3 y el omega 6) que son esenciales para el ser humano. Tienen un efecto beneficioso en general, disminuyendo el colesterol total <sup>(25)</sup>.
15. **GRASAS SATURADAS:** Este tipo de grasas es sólida a temperatura ambiente. Las grasas formadas por ácidos grasos de cadena larga (más de 8 átomos de carbono), como los ácidos láurico, mirístico y palmítico, se consideran que elevan los niveles plasmáticos de colesterol asociado a las lipoproteínas LDL. Sin embargo, las grasas saturadas basadas en el esteárico tienen un efecto neutro <sup>(25)</sup>.

# CAPÍTULO III

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. MATERIALES BIOLÓGICOS:

##### 3.1.1.1. Muestra vegetal:

Semillas de chía cultivadas en Mollepata – Anta, perteneciente al departamento de Cusco.

##### 3.1.1.2. Animales de experimentación:

Se utilizarán 40 ratas albinas hembras de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa holtzman, certificadas por el Instituto Nacional de Salud, (Anexo N°6).

Para la determinación de la toxicidad aguda se utilizarán 28 ratones albinos hembras de la especie *Mus musculus* de la cepa Balb/c/CNPB, certificadas por el Instituto Nacional de Salud, (Anexo N°7).

#### 3.1.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS:

##### 3.1.2.1. MATERIALES DE LABORATORIO

- Equipos:

- Picnómetro
- Balanza analítica (OHAUS)
- Refractómetro (ABBE SCHMIDT & HAENSCH - AR 12)
- Equipo de Soxhlet
- Extractor de fluidos supercríticos (Waters MV10).
- Espectrofotómetro (Jasco V-630)
- CG/MS (Agilent 6890N)
- Termómetro
- Baño maría (Memmert WNB10)
- Centrifuga ( GREETMED GT 119-100T)
- pH- metro ( Pocket pH- meter can BNC)
- Microscopio (Leica DM500)

- **Materiales de vidrio**
  - Tubos de ensayo.
  - Erlenmeyer de 250 ml
  - Buretas
  - Pipetas volumétricas 3, 5, 10ml.
  - Bagueta
  - Frasco ámbar.
  - Probetas de diferentes calibres
- **Reactivos:**
  - Agua destilada
  - Alcohol etílico al 95° o etanol al 95%
  - Almidón al 1% (almidón indicador, solución al 1%)
  - Bencina
  - Cloroformo
  - HCl 0.1N (ácido clorhídrico al 0.1 N)
  - Yoduro de potasio 15%
  - KOH 0.1N (hidróxido de potasio al 0.1N)
  - KOH 0.1N etanólico
  - NaOH 0.1N etanólico (hidróxido de sodio al 0.1N etanólico)
  - Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.1N (tiosulfato de sodio al 0.1N)
  - NaCl 0.5N (cloruro de sodio al 0.5N)
  - NaOH 0.1N (hidróxido de sodio al 0.1N)
  - Solución indicadora de fenolftaleína al 1%.
  - Kit de colesterol (Colestat - Wiener Lab.)
  - Kit de HDL (HDL colesterol - Wiener Lab.)
  - Kit de LDL (LDL colesterol - Wiener Lab.)
  - Kit de triglicéridos (TG color - Wiener Lab.)
  - Pancreatina 1%
  - Bilis de vacuno
  - Agua destilada
- **Otros materiales**
  - Jaulas
  - Cánula orogástrica
  - Marcadores

- Jeringas 1,3 y 5 cc
- Papel boom
- Papel filtro
- Mortero
- Bolsas de polietileno
- Aguja número 21
- Picetas
- Soporte universal
- Micropipetas 100, 1000ul
- Gradilla
- Espátulas

### 3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN Y DISEÑO METODOLÓGICO

Es de tipo cuantitativo y cualitativo, cuasiexperimental con preprueba y postprueba.

### 3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

CUADRO 2: CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL Y ANIMAL.

	<b>CRITERIO DE INCLUSIÓN</b>	<b>CRITERIO DE EXCLUSIÓN</b>
<b>DE LA ESPECIE VEGETAL</b>	Se incluyeron solo las semillas en buen estado.	Se excluyeron, semillas que se encontraron en mal estado, es decir descompuestas.
<b>DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b>	RATAS: Se incluyeron ratas albinas jóvenes certificadas por la INC, cepa Holtzman con un peso de (150g +/- 20 g.). Ratones: Se incluyeron ratones certificados por la INS, con un peso de 20-25g aproximadamente.	RATAS: Se excluyeron ratas y ratones que tuvieron pesos menores.

### 3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

**Para la determinación de la toxicidad aguda del aceite de *Salvia hispánica L.* (Chía), por vía oral**

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>6</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>7</sub>	O <sub>7</sub>

G<sub>n</sub>: Grupo de ratas albinas donde n=4 ratas por grupo.

G<sub>(1-7)</sub>: Grupos sometido a diferentes dosis de aceite *Salvia hispánica L.* (Chía).

X<sub>(1-7)</sub>: Dosis del aceite *Salvia hispánica L.* (Chía) de

4, 8, 16, 32, 64,96 y 128 mL/kg de peso por vía oral.,

O<sub>(1-7)</sub>: Se observaron durante 7 días, registrando muertes y pesos cada tres días.

**Para determinar el efecto hipolipemiente del aceite de *Salvia hispánica L.* (Chía), y comparar con el fármaco de referencia por vía oral.**

G <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>3</sub>	O <sub>5</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>4</sub>	O <sub>7</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>5</sub>	O <sub>9</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>10</sub>

G<sub>n</sub>: Grupo de ratas albinas donde n=6 ratas.

G<sub>1</sub>: Grupo control negativo suero fisiológico

G<sub>2</sub>: Grupo control positivo atorvastatina.

G<sub>3-5</sub>: Grupos sometido a diferentes dosis de aceite *Salvia hispánica L.* (Chía), por vía oral.



X<sub>1</sub>: Con suero fisiológico

X<sub>2</sub>: Dosis 10mg/día de atorvastatina, por 14 días.

X<sub>3-5</sub>: Dosis de 0.5, 1 y 2mg/kg del aceite *Salvia hispánica L.* (Chía), por vía oral, por 15 días.

O<sub>(1, 3, 5, 7 y 9)</sub>: Medición del colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos antes de la administración de la estatina y del aceite *Salvia hispánica L.* (Chía).

O<sub>(2, 4, 6, 8 y 10)</sub>: Medición del colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos después de la administración de la estatina y del aceite *Salvia hispánica L.* (Chía).

### 3.5. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

CUADRO 3: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES IMPLICADAS

VARIABLES IMPLICADAS	INDICADOR	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA / FORMA / ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO / INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p><b>Aceite de las semillas de <i>Salvia hispánica</i> L. (chía).</b></p>	<p>Extracción del aceite de chía</p>	<p>Líquido viscoso de color amarillo claro brillante, con un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados <sup>(18)</sup>.</p>	<p>Cuantitativo Indirecta Razón</p>	<p>El procedimiento que se siguió fue: selección de las semillas, secado, limpieza, molienda y triturado, para luego extraer en los equipos de extracción de Soxhlet y Fluidos supercríticos <sup>(27)</sup>.</p> <p>Instrumentos: Soxhlet y Fluidos supercríticos</p>	<p>Porcentaje del aceite extraído de las semillas de chía. (%)</p>
	<p>Perfil de ácidos grasos</p>	<p>Se define como la concentración de ácidos grasos presentes en el aceite <sup>(30)</sup>.</p>	<p>Cuantitativa Directa Razón</p>	<p>Se realizó según el método descrito en el manual del cromatógrafo de gases Agilent 6890N <sup>(31)</sup>.</p> <p>Instrumento: Cromatógrafo de Gases Acoplado a Espectrómetro de Masas</p>	<p>% de ácidos grasos</p>

VARIABLES IMPLICADAS	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA / FORMA / ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO / INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
<p><b>Efecto hipolipemiente del aceite de las semillas de <i>Salvia hispánica</i> L. (chía)</b></p>	<p>Acción de reducir o disminuir los niveles de lípidos en sangre <sup>(28)</sup>.</p>	<p>Cuantitativa Indirecta Razón</p>	<p>Se tomó muestra de sangre para la determinación del perfil lipídico que se determinara por el método bioquímico-enzimático donde se medirán las absorbancias en el espectrofotómetro. Instrumento: Espectrofotómetro</p>	<p>-Disminución del colesterol total (mg/dl) - Disminución del LDL (mg/dl) - Disminución del HDL (mg/dl) - Disminución del nivel de triglicéridos (mg/dl)</p>
<p><b>Toxicidad aguda</b></p>	<p>Medida usada para medir el grado tóxico de algún elemento <sup>(29)</sup>.</p>	<p>Cuantitativa Indirecta Razón</p>	<p>Se administró 7 dosis diferentes del aceite de las semillas de <i>Salvia hispánica</i> L. (chía), por 7 días, observándose las muertes y pérdida de peso <sup>(13)</sup>. Mediante el programa <i>Probit</i> se obtuvo la DL50. Instrumento: Programa <i>Probit</i></p>	<p>DL50 (ml/kg de peso)</p>
<b>VARIABLES DEPENDIENTES</b>				

CUADRO 4: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES NO IMPLICADAS.

VARIABLES NO IMPLICADAS	DEFINICIÓN DE LA VARIABLE	INDICADOR	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA/ FORMA/ ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO /INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
V A R I A B L E S	Propiedades que son medibles, que definen el estado del aceite u otra sustancia e indican la calidad del aceite de chía <sup>(32, 33)</sup> .	Densidad	Relación entre la masa y el volumen de una sustancia <sup>(33)</sup> .	Cuantitativo Indirecta Razón	La medición de la densidad se realizó por el método del picnómetro <sup>(33)</sup> .  Instrumento: Picnómetro	(g/ml)
		Índice de refracción	Relación de la velocidad de luz en el aire y la velocidad de la luz de una determinada longitud de onda <sup>(34)</sup> .	Cuantitativa directa Razón	La medición del índice de refracción se realizó por método directo utilizando el Refractómetro de ABBE. A 20°C <sup>(34)</sup> .  Instrumento: Refractómetro	-----
		Índice de Acidez	Es el número de miligramos de hidróxido potásico que se requieren para neutralizar los ácidos grasos libres contenido en un gramo de grasa <sup>(35)</sup> .	Cuantitativo Indirecta Razón	Según las Normas Técnicas Peruana (NTP) <sup>(35)</sup> .	mg de NaOH/g de aceite
I						

<b>N T E R V I N I E N T E S</b>								
				Índice de peróxidos	Es la medida del contenido de oxígeno reactivo, expresada en términos de miliequivalentes de oxígeno por 1000g de grasa <sup>(36)</sup> .	Cuantitativo Indirecta Razón	Según las Normas Técnicas Peruana (NTP) <sup>(36)</sup> .	meq O <sub>2</sub> activo/kg de aceite.
			Índice de yodo	Mide la instauración de grasas que contienen enlaces dobles conjugados <sup>(37)</sup> .	Cuantitativo Indirecta Razón	Según las Normas Técnicas Peruana (NTP) <sup>(37)</sup> .	g de yodo/g de grasa	
			Índice de saponificación	Es la medida de la cantidad de triglicéridos y la composición de los ácidos grasos presentes en el aceite <sup>(38)</sup> .	Cuantitativo Indirecta Razón	Según las Normas Técnicas Peruana (NTP) <sup>(38)</sup> .	mg KOH/g de aceite.	

### **3.6. PROCEDIMIENTOS**

#### **3.6.1. PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE CRUDO DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L.* (chía), POR EL EQUIPO DE SOXHLET**

##### **1. SELECCIÓN Y LIMPIEZA.**

Esta operación se realizó manualmente para separar las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) en mal estado (presencia de hongos), maltratadas, etc., <sup>(27)</sup> (Fotografías N° 1 y 2).

##### **2. PESADO.**

El pesado de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), se realizó en una balanza electrónica y se colocaron en bolsas de polietileno de color oscuro <sup>(27)</sup>.

##### **3. SECADO.**

El secado se realizó en estufa, en donde se le colocaran en bandejas para un secado eficaz temperatura de 20 – 40°C, se le pesó diariamente hasta obtener tres pesos consecutivos <sup>(34)</sup>, (Fotografía N° 3).

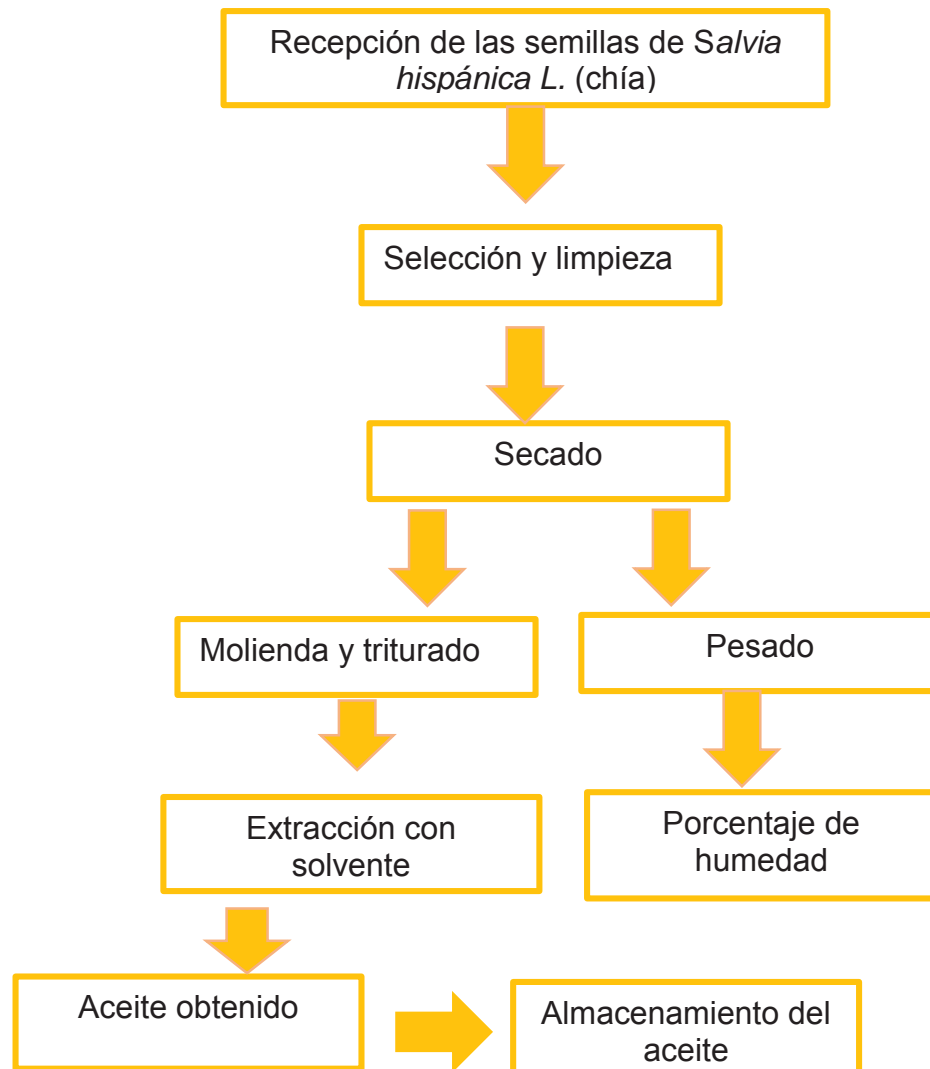
##### **4. MOLIENDA Y TRITURADO.**

Esta operación se realizó ingresando las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), seleccionadas y pesadas a un molino de granos, para reducir a un tamaño de partículas <sup>(27)</sup>.

##### **5. EXTRACCIÓN POR SOLVENTES.**

Para la extracción del aceite se utilizó el equipo de Soxhlet, en donde se colocó 20g de muestra envuelta en papel filtro al equipo, seguidamente se le agrego hexano y se puso a calentar a una temperatura de 40°C, luego de cinco sifoneadas el aceite extraído se recolectó en un envase previamente pesado para así determinar el porcentaje de rendimiento y se almacenó en frascos de vidrio ámbar y se protegió de la luz <sup>(27)</sup>.

FLUJOGRAMA 1: EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (CHÍA) EN EQUIPO DE SOXHLET.



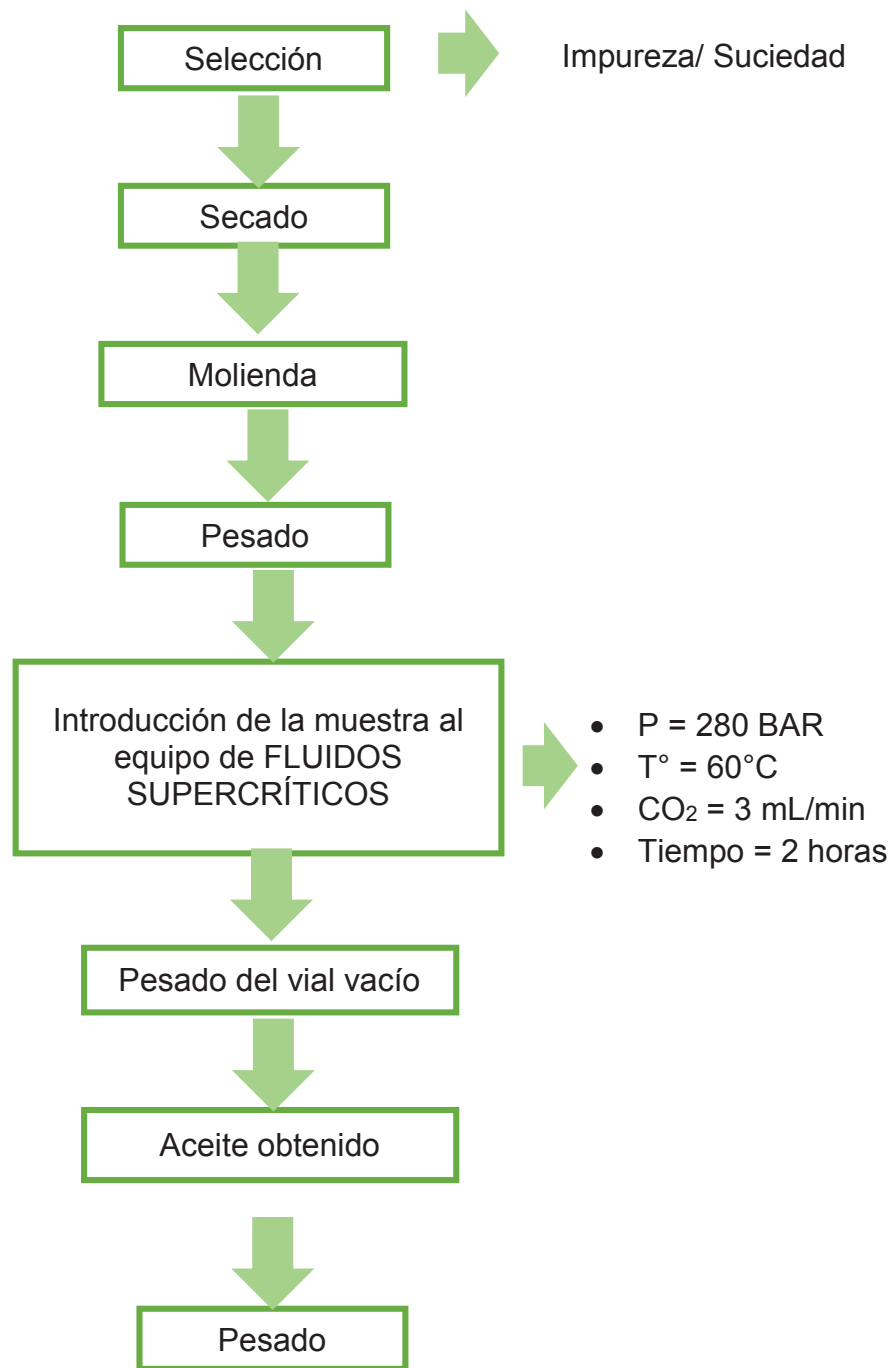
**Fuente:** Elaboración propia.

### **3.6.2. PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (chía), POR EL EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

1. La extracción se realizó en el laboratorio de Nutrición de la Escuela Profesional de Zootecnia, en Kayra.
2. El aceite extraído por este equipo fue el que se utilizó en la investigación.
3. Las semillas de chía secas y molidas se pesaron aproximadamente de 7-8 gramos.
4. Se colocó en el equipo, luego se programó las condiciones de extracción en el software de control del extractor de fluidos súper críticos modelo MV10-waters, (Fotografía N°6).
5. Las condiciones con las que se trabajaron fueron: la temperatura, presión y el flujo del CO<sub>2</sub> que fue el fluido supercrítico con el que se extrajo el aceite.
6. El aceite de las semillas de chía se extrajo a una temperatura de 60°C, la presión de 280 bar y un flujo de 3.5 mL/minuto de CO<sub>2</sub>, (Fotografía N°7).
7. El tiempo en que se extrajo el aceite fue de dos horas aproximadamente desde las condiciones ya estabilizadas. (Anexo N°4)



FLUJOGRAMA 2: EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (CHÍA), POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.



**Fuente:** Elaboración propia

### 3.6.3. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE

#### 3.6.3.1. DENSIDAD:

##### Método del picnómetro:

1. Se pesó el picnómetro vacío
2. Se llenó el picnómetro de la muestra y se peso
3. Se halló la densidad de acuerdo a la ecuación: (Fotografía N°8).

$$D = \frac{(W_{\text{picnómetro} + \text{muestra}}) - W_{\text{picnómetro vacío}}}{V_{\text{picnómetro}}}$$

Dónde:

D= Densidad.

W = Peso.

V = Volumen.

#### 3.6.3.2. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Se utilizó el refractómetro ABBE, en donde se colocó una gota del aceite de chía en el refractómetro y se llevó a una temperatura de 20°C y luego se procedió a leer el ángulo correspondiente al índice que se registra sobre la escala graduada en índice de refracción, visible en el visor, (Fotografía N°9).

#### 3.6.3.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ACEITE DE *Salvia hispánica L.* (chía)

El procedimiento de las Características químicas para el aceite de *Salvia hispánica L.* (chía) se realizaron según las Normas Técnicas Peruanas.

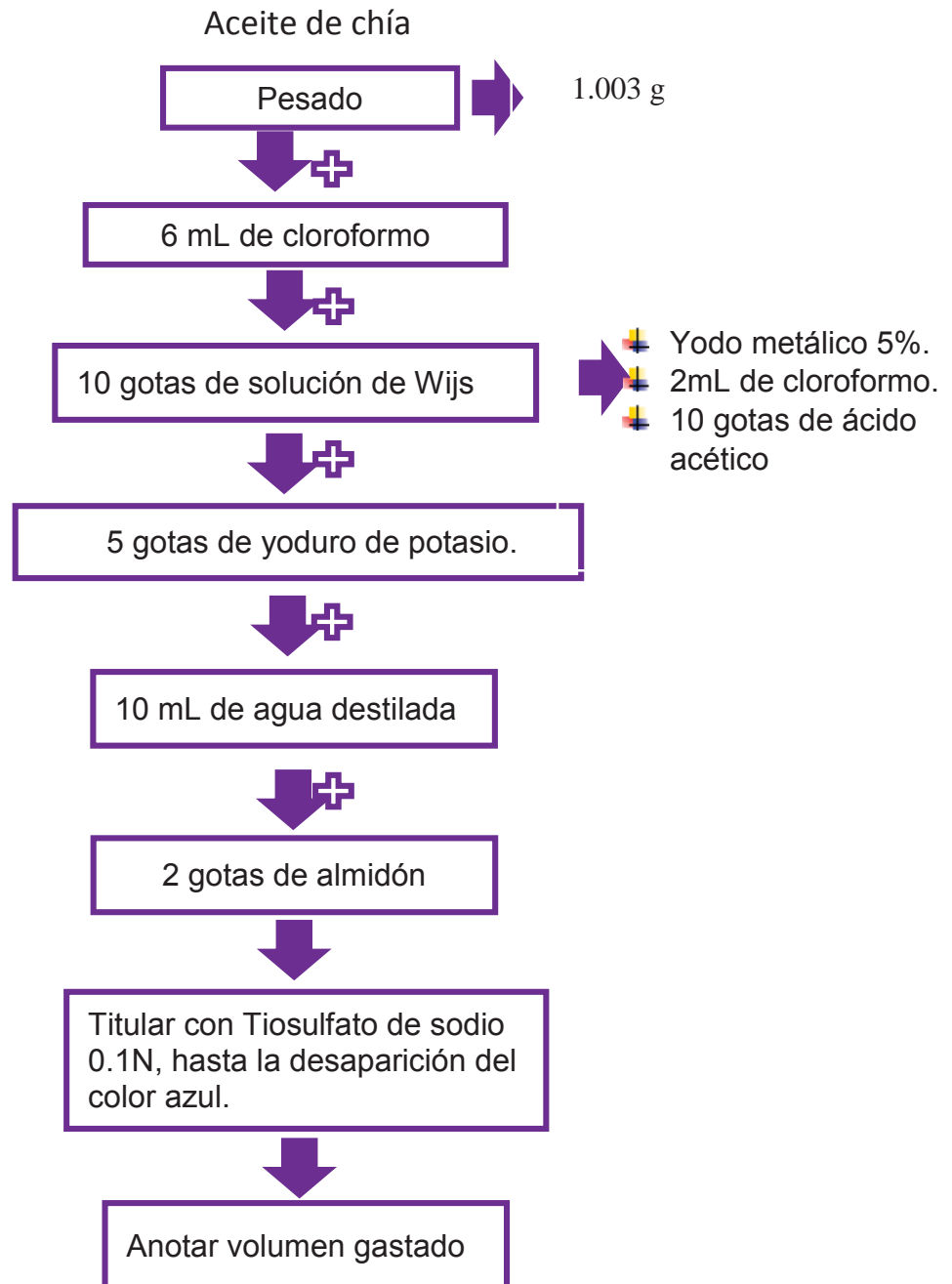
**CUADRO 5: MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ACEITE**

<b>CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS</b>	
<b>ÍNDICE DE ACIDEZ LIBRE</b> Fotografía N°11	NORMA TECNICA PERUANA NTP 209.005 1968 (REVISADA EL 2011) <sup>(35)</sup> .
<b>ÍNDICE DE YODO</b> Fotografía N°10	NORMA TECNICA PERUANA NTP 209.008 1968 (REVISADA EL 2011) <sup>(37)</sup>
<b>ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN</b> Fotografía N°14	NORMA TECNICA PERUANA NTP 209.058 1980 (REVISADA EL 2011) <sup>(38)</sup>
<b>ÍNDICE DE PERÓXIDOS</b> Fotografía N°12 Y 13	NORMA TECNICA PERUANA NTP 209.006 1968 (REVISADA EL 2011) <sup>(36)</sup>

**Fuente:** Elaboración propia.

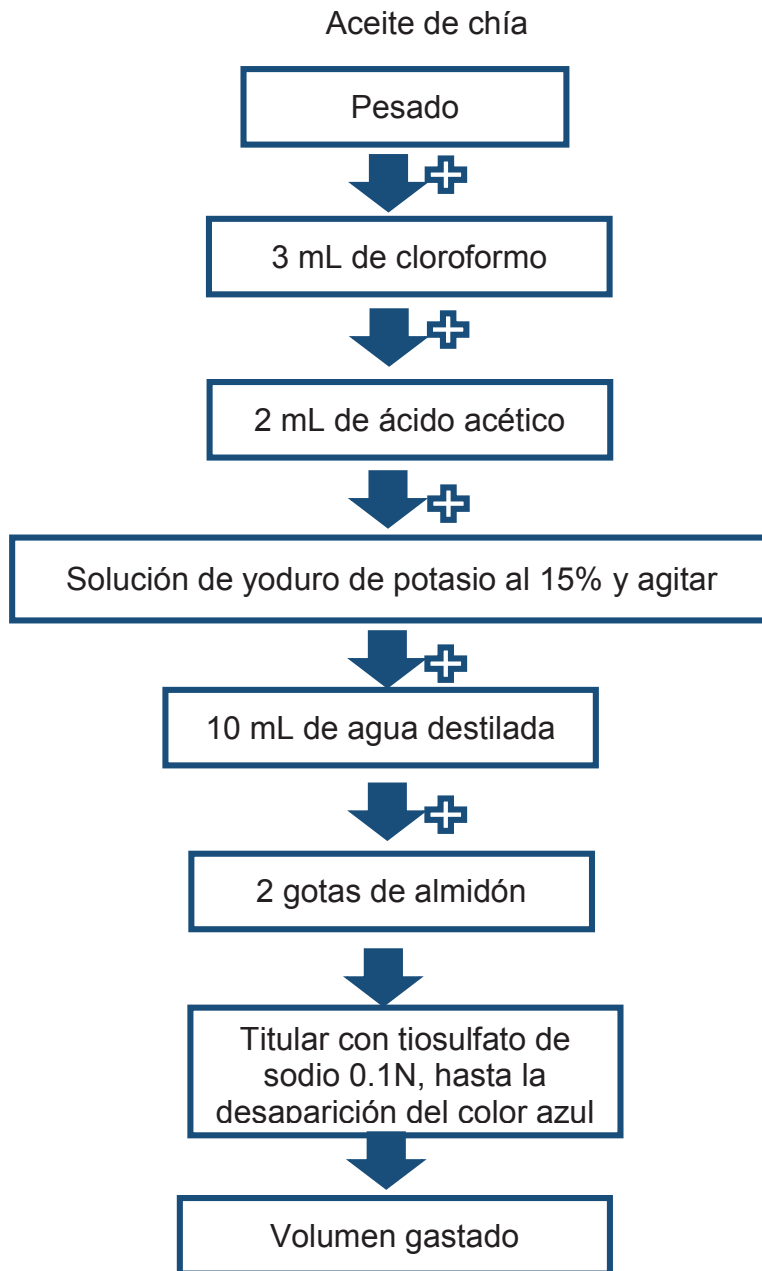
### 3.6.3.4. FLUJOGRAMA DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS PARA EL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE CHÍA (*Salvia hispánica L.*)

FLUJOGRAMA 3: ÍNDICE DE YODO



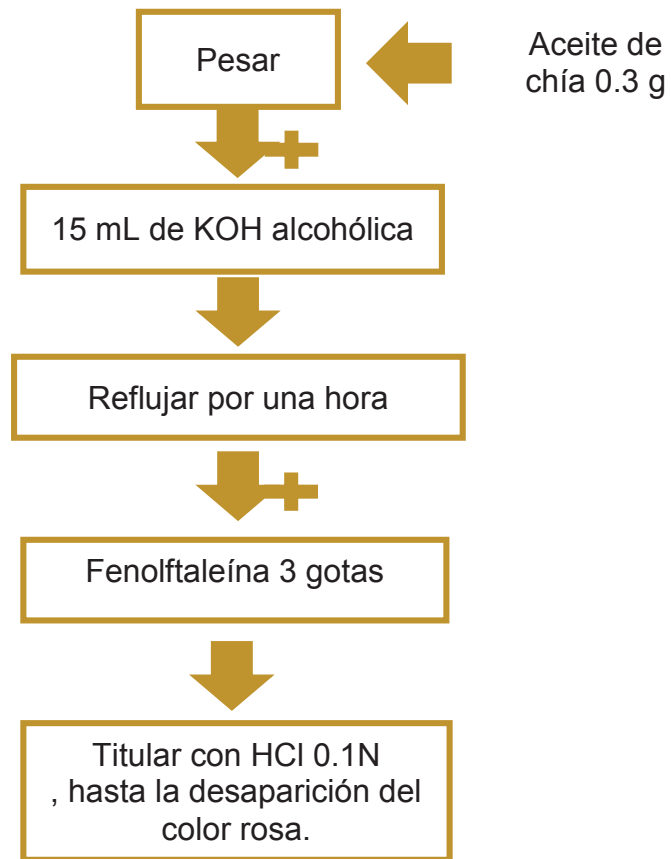
Fuente: Elaboración propia

FLUJOGRAMA 4: ÍNDICE DE PERÓXIDOS



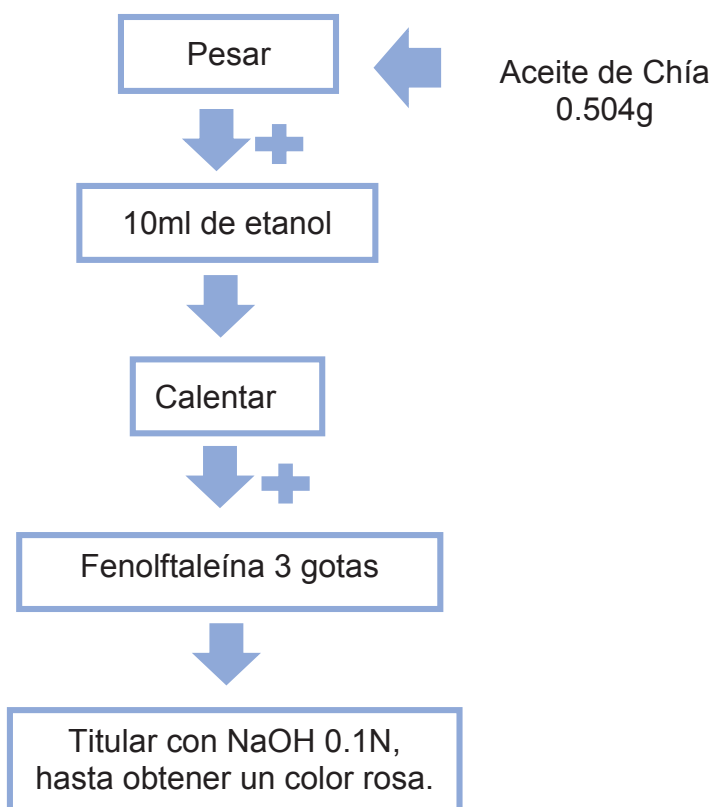
**Fuente:** Elaboración propia

FLUJOGRAMA 5: ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN



**Fuente:** Elaboración propia

FLUJOGRAMA 6: ÍNDICE DE ACIDEZ



**Fuente:** Elaboración propia

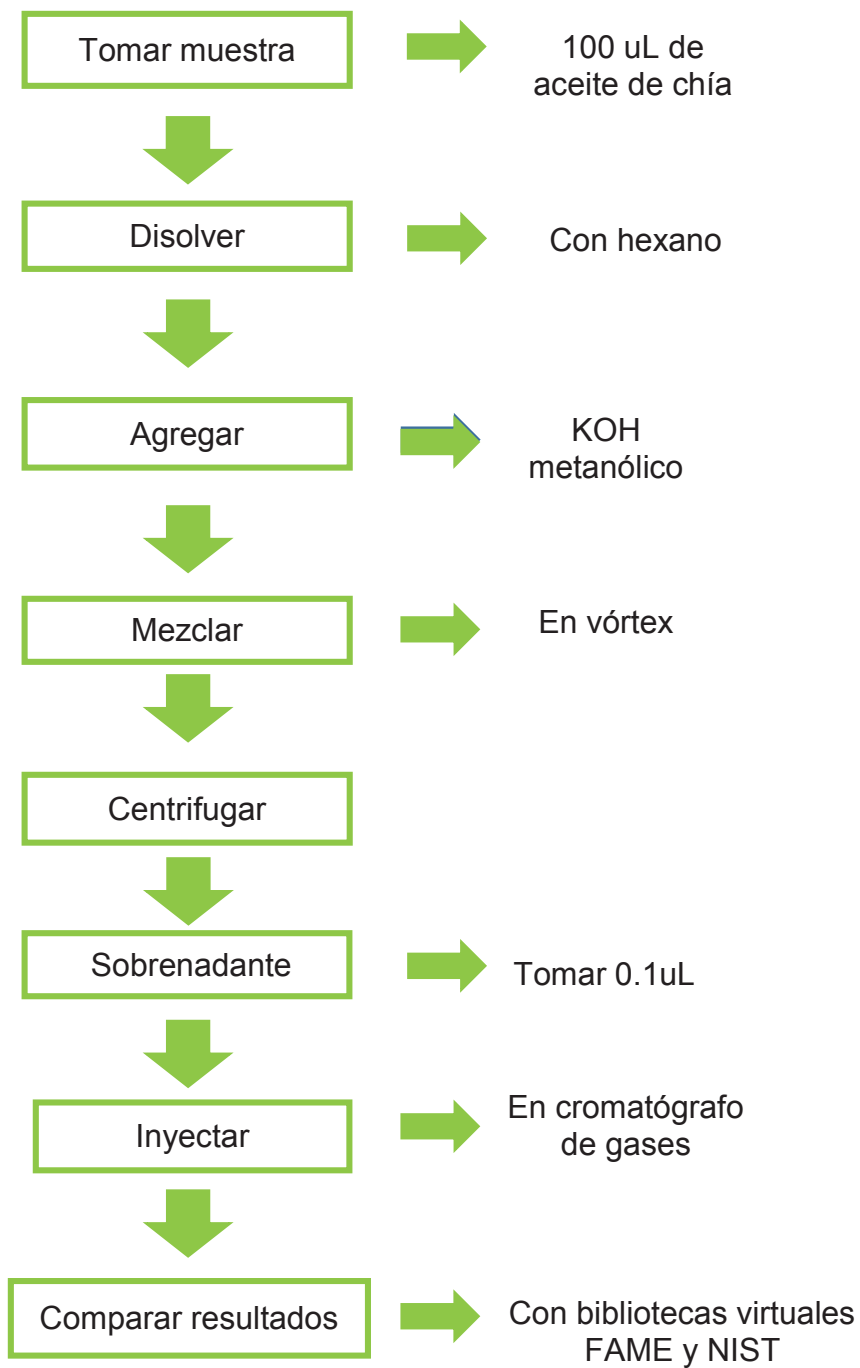
### 3.6.4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El método que se utilizó para la preparación de la muestra fue el método 1 del manual <sup>(31)</sup> del equipo, en nuestro caso la muestra que se utilizó fue de 100uL a la cual a esta proporción se redujo los demás valores, el procedimiento consiste en:

1. Se tomó 20 mL de muestra en un tubo de ensayo con tapón de rosca o en un vial.
2. Se disolvió la muestra en 10mL de hexano.
3. Se le agregó 100uL de hidróxido de potasio en metanol
4. Se cerró el tubo o vial y se llevó al vórtex por 30 segundos y luego se centrifuga
5. Luego el sobrenadante se transfiere a otro vial.
6. Se inyectó 0.1µL en la cabeza de la columna cromatografía o Puerto de Inyección
7. La temperatura del horno fue desde 140°C hasta 230°C por un periodo de tiempo de 35 minutos
8. Este equipo estuvo conectado a un detector el cual emitió picos a un tiempo determinado, este pico se comparó con dos bibliotecas virtuales para ácidos grasos.
9. Las condiciones a las cuales se determinó los ácidos grasos presentes y la constancia del análisis están en el (Anexo N°2 y 5)



FLUJOGRAMA 7: PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES  
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS



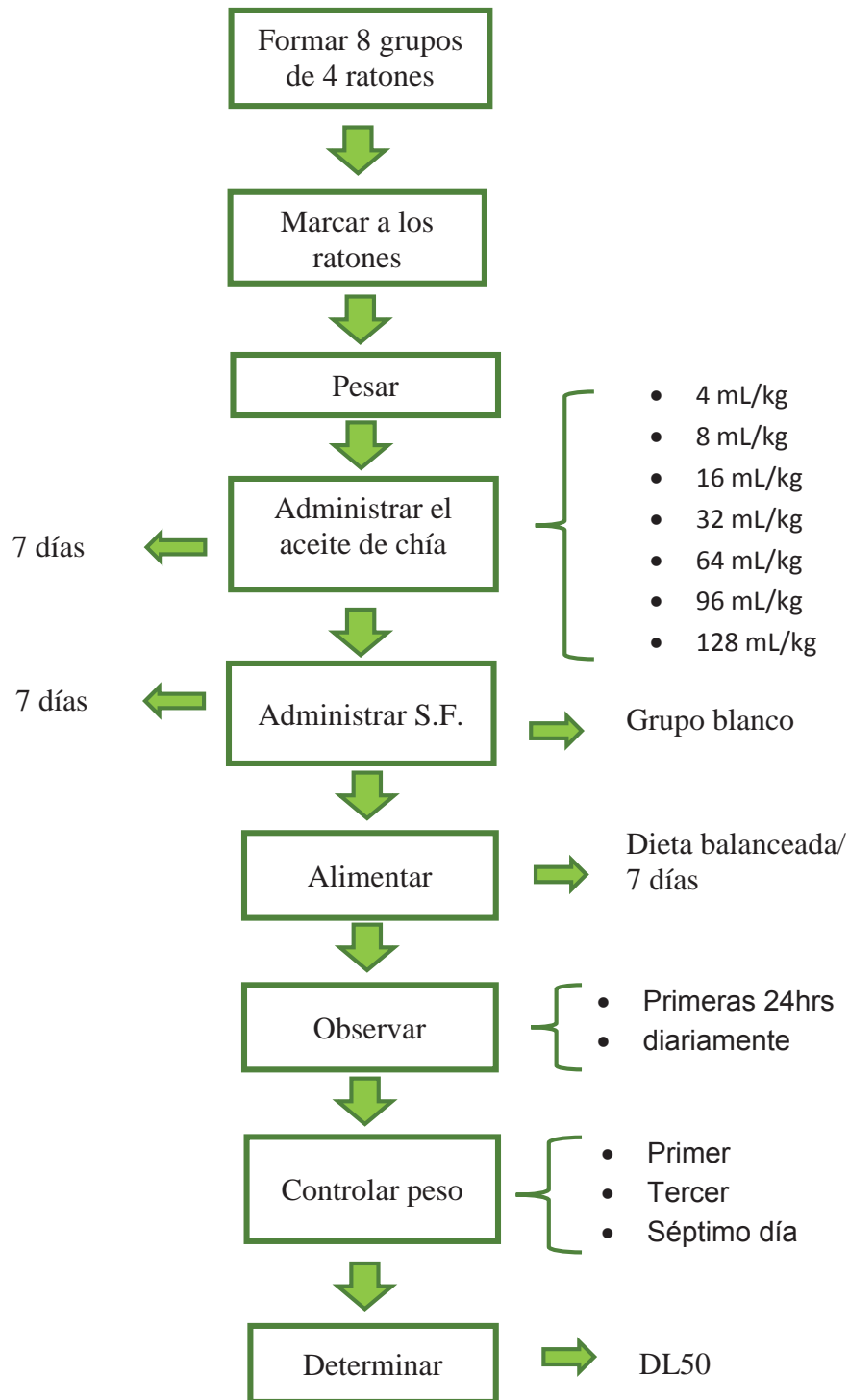
**Fuente:** Elaboración propia

### **3.6.5. MÉTODO PARA EVALUAR TOXICIDAD AGUDA Y EL EFECTO HIPOLIPEMIANTE.**

#### **3.6.5.1. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA**

1. Se formaron siete grupos de cuatro ratones cada uno, en total se utilizaron 28 ratones de experimentación, que fueron traídos del bioterio del Instituto Nacional de Salud, (Fotografía N°15).
2. Los animales de experimentación (ratones), fueron alimentados de forma balanceada durante los siete días con un alimento para ratas del bioterio.
3. El aceite de *Salvia hispánica L. (Chía)*, fue administrado por vía oral mediante una cánula, con un periodo de ayuno previo de 24 horas.
4. Se ensayaron siete niveles de dosis (4, 8, 16, 32, 64, 96, 128 mL/kg), desde una mínima hasta una máxima, con el propósito de determinar la dosis letal media (DL50), siguiendo el método que utilizó Ibañez (2006) <sup>(13)</sup>, en su trabajo de investigación del aceite de Sacha Inchi, que se basaron en el protocolo de la OCDE 420, donde se usaron dosis crecientes y para determinar las dosis se utilizó una prueba piloto. <sup>(13)</sup>
5. Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24 horas y diariamente durante siete días donde se registraron cualquier cambio de comportamiento observable. El peso corporal se controló al primer, tercer, y séptimo día del experimento.

FLUJOGRAMA 8: DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA



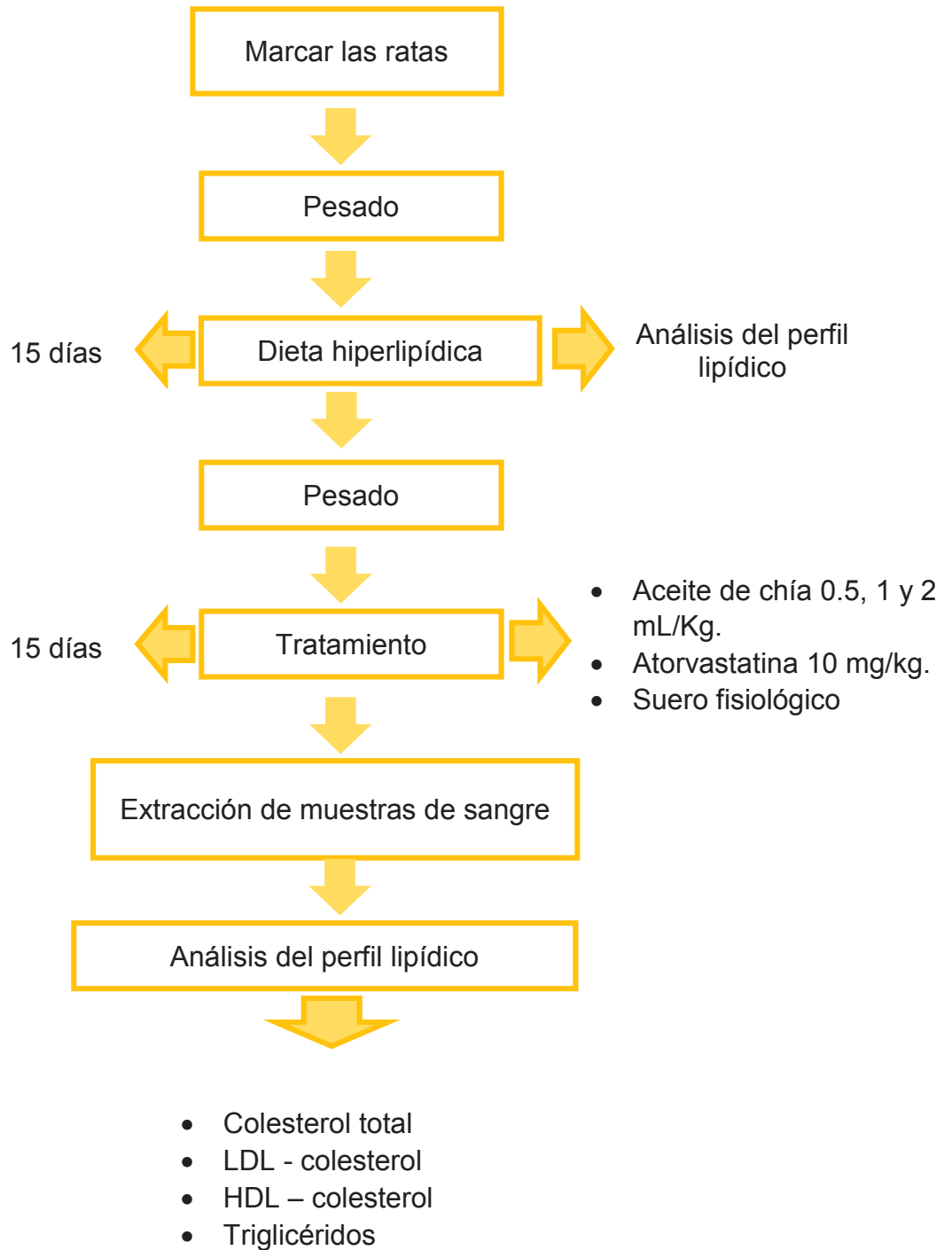
Fuente: Elaboración propia

### **3.6.5.2. PROCEDIMIENTO DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE**

1. Se formaron 6 grupos y cada uno con 5 ratas, en total se utilizaron 30 ratas de experimentación, (Fotografía N°16).
2. Durante el periodo experimental, los animales permanecieron en jaulas y mantenidos a temperatura ambiente.
3. Durante un periodo de 15 días se les suministró alimento especial con un contenido de grasa saturada, se les alimentó con 30g al día y 15g aproximadamente de su alimento, el aporte de agua fue a libre demanda <sup>(29)</sup>.
4. Luego de los 15 días de haberlas alimentado con dieta hiperlipídica, se midió los valores basales del colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol y triglicéridos por el método enzimático colorimétrico, para esto se siguió el procedimiento del inserto adjunto del reactivo (Anexo N°8, 9, 10 y 11), la muestra de sangre se obtuvo de la cola del animal y en ayunas.
5. Seguidamente se procedió con la administración de suero fisiológico para el grupo control negativo, atorvastatina (10 mg/kg/día) para el grupo control positivo, y para los otros tres grupos se les administraron diferentes dosis del aceite de chía (0.5, 1 y 2 mL/kg de peso) <sup>(13)</sup>. (Fotografía N°17).
6. La administración fue diaria, se les administraron por vía oral mediante una cánula orogástrica durante 15 días, también se les continuó dando la dieta hiperlipídica mas su alimento.
7. Pasado el tiempo se procedió a la extracción de sangre de la cola y se colecto la muestra en tubos heparinizados. (Fotografía N°18)
8. Luego se analizaron las muestras, (Fotografía N° 19, 20 Y 21) por el método enzimático colorimétrico para colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol y triglicéridos (Fotografía N° 22 Y 23), para lo cual se siguieron los protocolos ya establecidos (Anexo N° 8, 9, 10 Y 11).

## FLUJOGRAMA 9: EFECTO HIPOLIPEMIANTE EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN RATAS

Distribución de 30 ratas en grupos de 6

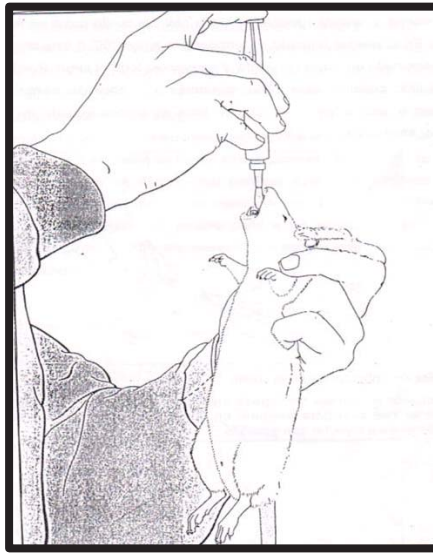


**Fuente:** Elaboración propia

### 3.6.5.3. PROCEDIMIENTO DE ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL

1. La administración del aceite fue por vía oral, mediante una cánula orogástrica.
2. Al animal se le sujetó y se le colocó en forma vertical con la cabeza hacia arriba, estirando la cola hacia abajo para que no se mueva.
3. Luego se introdujo lentamente la cánula teniendo cuidado de entrar a la tráquea <sup>(39)</sup>.

*FIGURA 6: ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL*



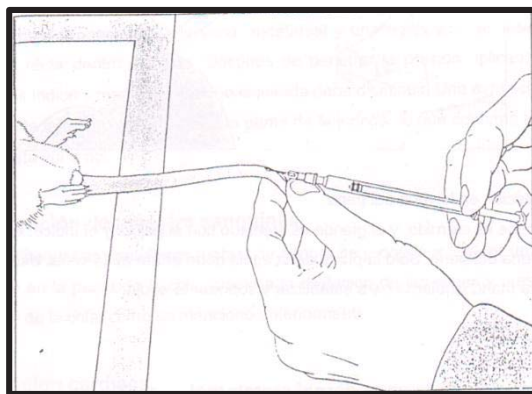
**Fuente:** (Fuentes, 2008) <sup>(39)</sup>.

### 3.6.5.4. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA POR LA COLA

Se utilizaron las dos venas ventrolaterales de la cola de la rata. Antes de la inserción de la aguja 21G, la cola fue sumergida unos dos minutos en agua caliente (40° C), para dilatar las venas.

Luego se desinfectó la zona y se procedió a recolectar la muestra de sangre, aproximadamente 1 mL y se recolectó en tubos heparinizados <sup>(39)</sup>.

FIGURA 7: TOMA DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS BIOQUÍMICO



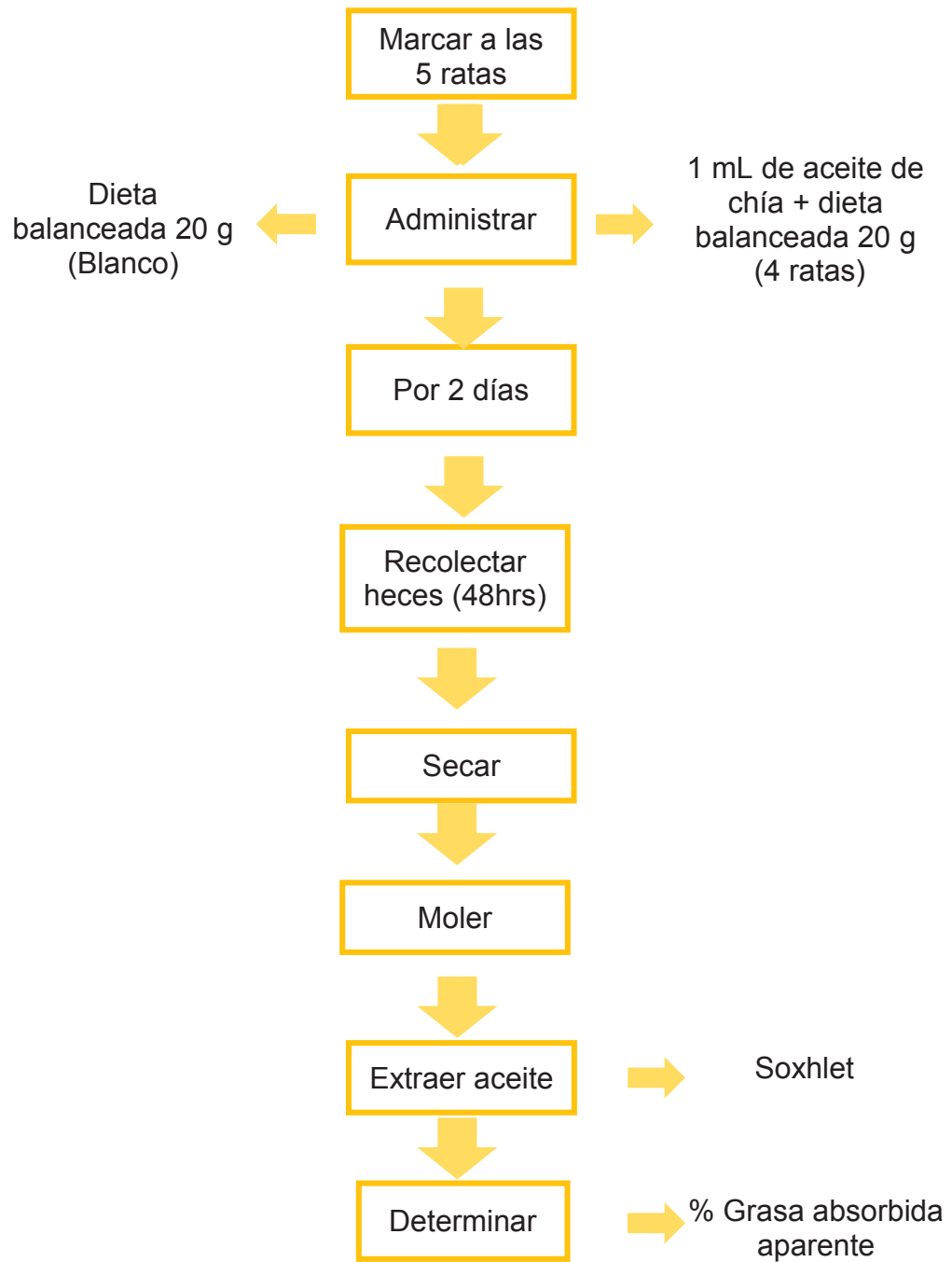
Fuente: (Fuentes, 2008) <sup>(39)</sup>.

### 3.6.6. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ABSORCIÓN APARENTE DEL ACEITE DE CHIA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

1. Se formó un grupo conformado por 5 ratas (Fotografía N° 27),
2. Teniendo un blanco que solo se le administró su alimento 20 g previo ayuno de 12 horas, durante dos días.
3. A los cuatro restantes se les administró el aceite de chía de 1mL previo ayuno de 12 horas, también durante dos días.
4. Después de los dos días se recolectaron las heces de las ratas de experimentación, tanto del blanco y de los que recibieron aceite (Fotografía N°28).
5. Las heces recolectadas se hicieron secar y se procedió a moler.
6. Se determinó el contenido de grasa excretada en las heces de las ratas de experimentación mediante el equipo de extracción de Soxhlet, (Fotografía N° 29) <sup>(40)</sup>.
7. Para la determinación cuantitativa de la absorción aparente del aceite de chía en el tracto gastrointestinal de las ratas de experimentación, (Fotografía N° 30), se usó la siguiente fórmula <sup>(41)</sup>.

$$\text{Absorción aparente (\%)} = \frac{\text{Consumo (g)} - \text{Pérdida en heces (g)} \times 100}{\text{Consumo (g)}}$$

**FLUJOGRAMA 10: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ABSORCIÓN APARENTE DEL ACEITE DE CHIA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**



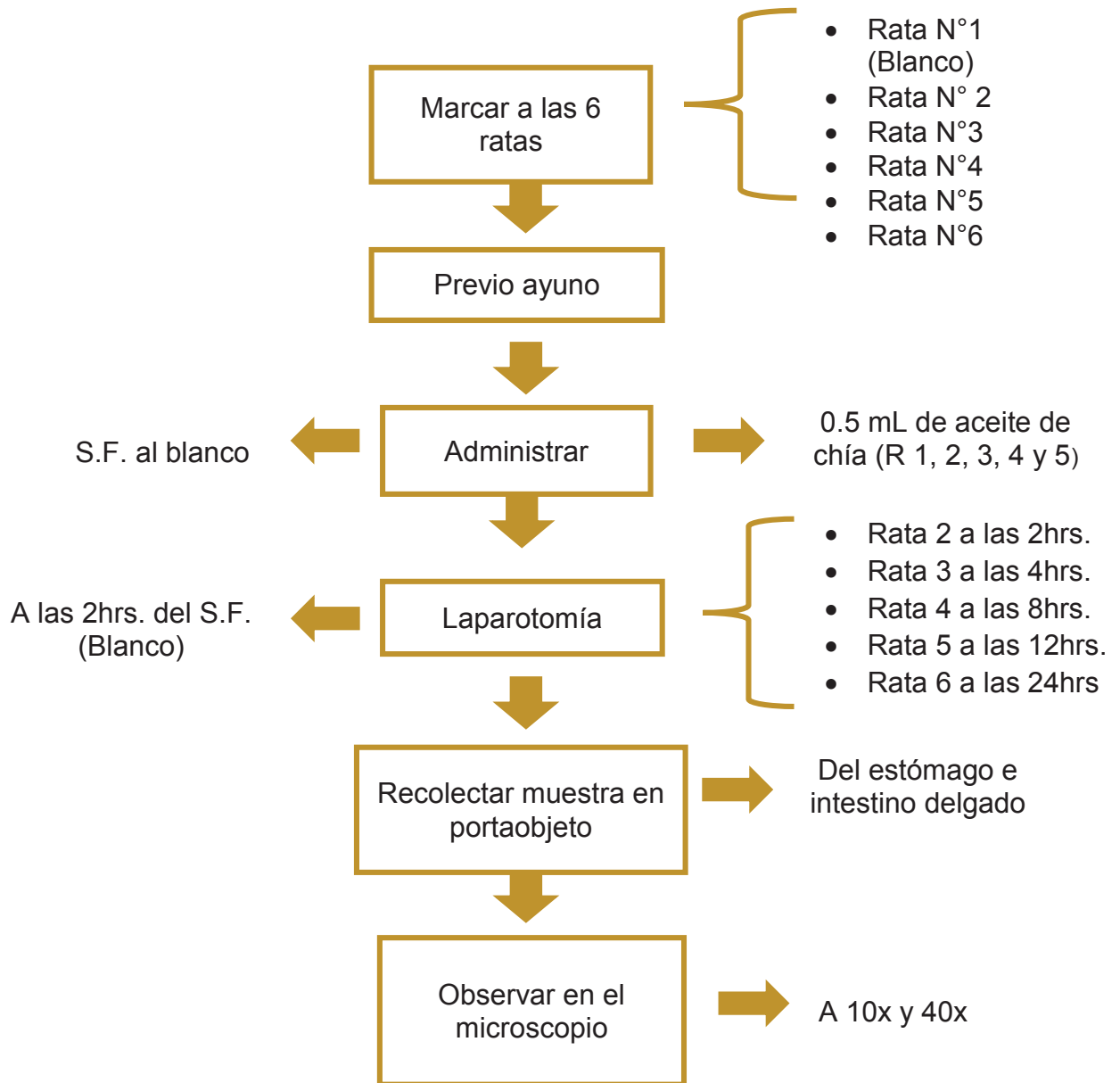
**Fuente:** Elaboración propia



### **3.6.7. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DEL ACEITE DE CHIA (*Salvia hispánica L.*) EN EL ESTÓMAGO E INTESTINO DELGADO DE LA RATA DE EXPERIMENTACIÓN (OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO).**

1. Este grupo estuvo conformado por 6 ratas de experimentación.
2. De este grupo se tomó una rata de experimentación, como blanco.
3. Y a los cinco restantes se les administró el aceite de chía.
4. Al blanco se le administró suero fisiológico y a los cinco restantes se les administró el aceite de chía por vía oral 0.5 mL, al mismo tiempo.
5. Luego se les hizo una laparotomía <sup>(42)</sup>, (Fotografía N° 31), después de las 2 horas, tanto al blanco (Rata N° 1) y a uno que se le administró el aceite (Rata N° 2)
6. Se tomaron muestras del estómago e intestino delgado en el portaobjetos (fotografía N° 32 y 33), seguidamente se observó al microscopio a 10X y 40X, para ver la presencia del aceite, (Fotografía N°34 y 35).
7. Luego de las 4 horas se le hizo laparotomía a la rata N° 3, que recibió también aceite de chía, de la cual se le tomó muestras del estómago e intestino delgado en el portaobjetos para la observación al microscopio.
8. Igualmente se les hizo laparotomía a las ratas N° 4, 5, 6; después de las 8, 12 y 24 horas de haberles administrado el aceite de chía, también se tomaron muestras de los estómagos e intestinos delgados de las ratas de experimentación, para la observación de la presencia del aceite de chía a las diferentes horas (Fotografías N° 36 al 47).

**FLUJOGRAMA 11: DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL ACEITE DE CHÍA (*Salvia hispánica L.*) EN EL ESTÓMAGO E INTESTINO DE LA RATA DE EXPERIMENTACIÓN (OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO).**

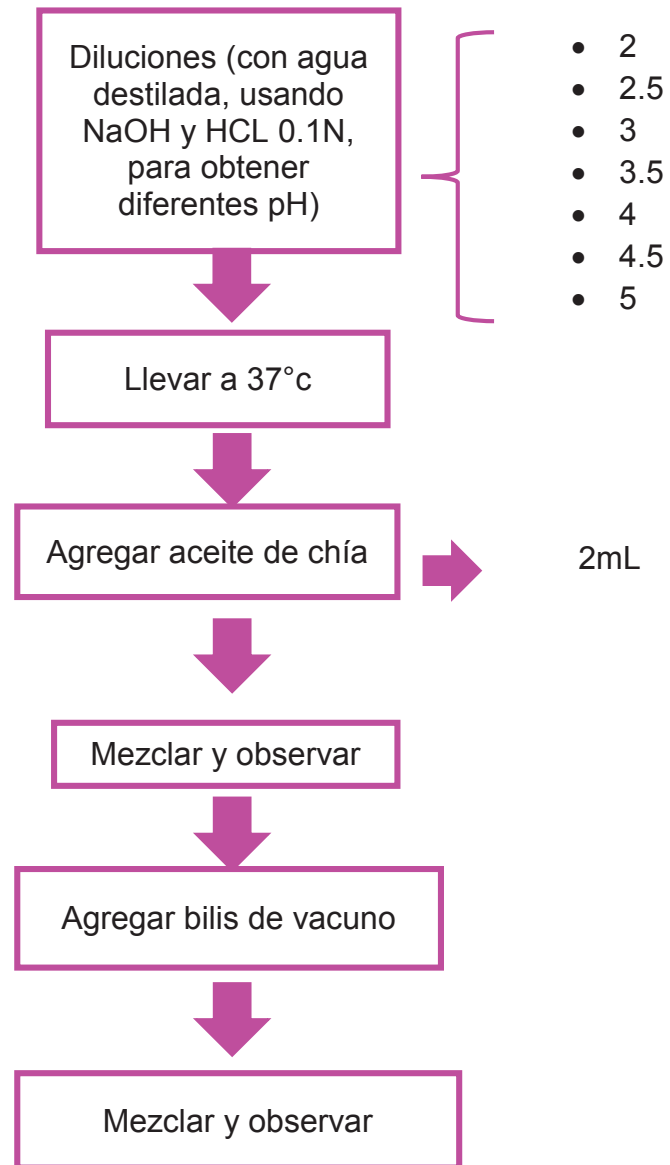


**Fuente:** Elaboración propia

### **3.6.8. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN “in Vitro” DE LA INFLUENCIA DE LOS PH DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN LA EMULSIÓN DEL ACEITE DE CHÍA (*SALVIA HISPÁNICA L.*)**

1. Se preparó con agua destilada diferentes diluciones de 10 mL cada uno, utilizando hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1N y ácido clorhídrico (HCl) 0.1N, para regular los pH <sup>(43)</sup>, en gradientes de 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5 y 5; que corresponde a los rangos del pH del estómago e intestino delgado de la rata de experimentación (Fotografía N° 24),
2. Se llevaron las soluciones a baño maría, a una temperatura de 37°C, (Fotografía N°25).
3. Luego cuando las soluciones estuvieron a una temperatura de 37°C, se les agregó 2 mL del aceite de chía (*Salvia hispánica L.*), a cada solución y se procedió a mezclar por 15 min y luego se observó si hubo emulsión <sup>(43)</sup>.
4. Después se le adicionó a cada vaso 1mL de bilis de vacuno para poder comparar la emulsión a diferentes pH tanto sin bilis y con bilis (Fotografía N°26).

FLUJOGRAMA 12: DETERMINACIÓN "in Vitro" DE LA INFLUENCIA DE LOS pH DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN LA EMULSIÓN DEL ACEITE DE CHÍA (*Salvia hispánica L.*)

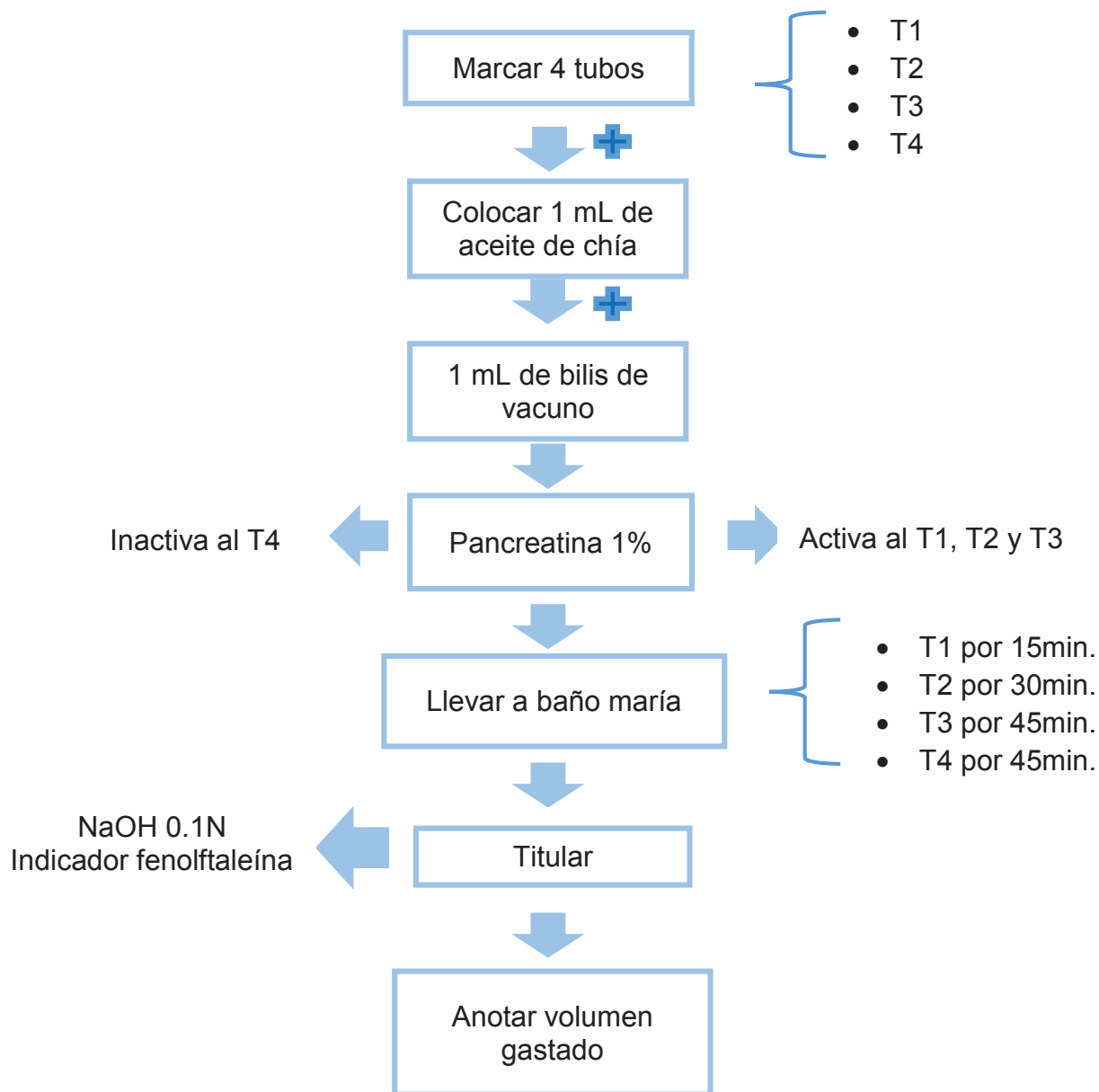


**Fuente:** Elaboración propia

### **3.6.9. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN “in Vitro” DE LA INFLUENCIA DE LA BILIS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE CHÍA (*Salvia hispánica L.*)**

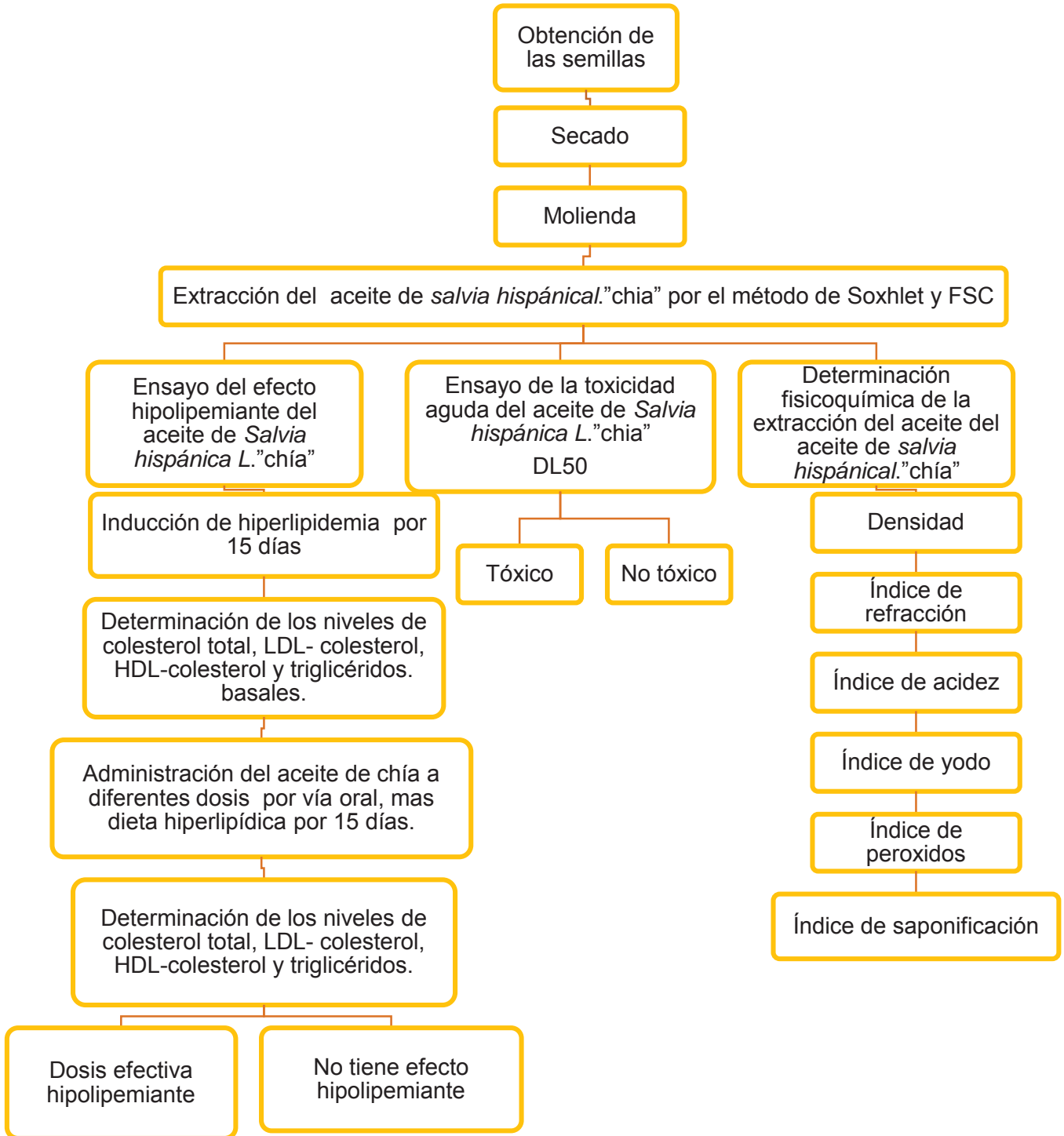
1. Se utilizó el protocolo de hidrólisis enzimática de lípidos.
2. Se colocaron en 4 tubos 1 mL de aceite de chía (*Salvia hispánica L.*) seguidamente se les agregó 1 mL de bilis de vacuno (fotografía N° 48).
3. Y a los 3 primeros tubos se les adicionó 1 mL de extracto neutro de pancreatina al 1% y al cuarto tubo 1 mL de extracto de pancreatina llevado a ebullición por 3 minutos <sup>(44)</sup>.
4. Estos tubos fueron llevados a baño María a 37°C y se les sacó a diferentes tiempos 15, 30 y 45 minutos respectivamente <sup>(44)</sup> y al cuarto tubo se le retiró a los 45 minutos.
5. Pasado el tiempo se les agregó 3 gotas de fenolftaleína y se procedió a la titulación con hidróxido de sodio 0.1N, hasta la desaparición del color rosa (Fotografías N°49 y 50).
6. Luego se determinó el porcentaje de hidrólisis enzimática del aceite de chía con el volumen gastado de NaOH 0.1N, (Fotografía N°51) <sup>(44)</sup>.

FLUJOGRAMA 13: DETERMINACIÓN "in Vitro" DE LA INFLUENCIA DE LA BILIS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE CHIA (*Salvia hispánica L.*)



**Fuente:** Elaboración propia

FLUJOGRAMA 14: FLUJOGRAMA GENERAL DE LOS PROCESOS DE INVESTIGACIÓN



Fuente: Elaboración propia

### 3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

CUADRO 6: TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, EXTRACCIÓN DEL ACEITE, EFECTO HIPOLIPEMIANTE Y TOXICIDAD AGUDA.

TÉCNICAS	INSTRUMENTO
<p>Observación laboratorial:</p> <p>Los resultados fueron recolectados a partir de métodos analíticos y experimentales.</p>	<p><b>ANEXO N°15:</b> Formato para las características fisicoquímicas del aceite de chía:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Densidad</li> <li>• Índice de refracción</li> <li>• Índice de saponificación</li> <li>• Índice de acidez</li> <li>• Índice de yodo</li> <li>• Índice de peróxidos</li> </ul> <p><b>ANEXO N°16:</b> Formato para la extracción del aceite de chía mediante Soxhlet y FSC.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cantidad de muestra</li> <li>• Peso de vial vacío</li> <li>• Peso de vial con aceite</li> <li>• Cantidad de aceite extraído</li> <li>• Porcentaje de rendimiento</li> </ul> <p><b>ANEXO N°13 y 14:</b> Formato para el efecto hipolipemiente</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Días</li> <li>• Peso de ratas</li> <li>• Dosis administradas</li> <li>• Absorbancia</li> <li>• Resultados basales</li> <li>• Resultados después del tratamiento</li> <li>• Observaciones</li> </ul> <p><b>ANEXO N°17 y 18:</b> Formato para la toxicidad aguda</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Días</li> <li>• Peso de ratones</li> <li>• Dosis administradas</li> <li>• N° de muertes</li> <li>• N° de vivos</li> <li>• Observaciones</li> </ul>

**Fuente:** Elaboración propia



### 3.8. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

CUADRO 7: TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE Y TOXICIDAD AGUDA.

<b>TÉCNICAS</b>	<b>ANÁLISIS</b>
Tratamiento de datos en Microsoft Office Word versión 2017.	Procesamiento de datos
Tratamiento de datos en Microsoft Office Excel versión 2017.	Tablas estadísticas
Análisis en SPSS versión 19.0	Análisis estadístico de los datos, utilizando los métodos de análisis de prueba T, ANOVA y post ANOVA y Duncan.
Análisis en el programa de <i>Probit</i>	Análisis de los datos para la determinación de la DL50.

**Fuente:** Elaboración propia

#### INTERVALO O PORCENTAJE DE CONFIANZA

Todas estas pruebas estadísticas se realizaron al 95 % de confianza.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1. PORCENTAJE DE HUMEDAD

TABLA 3: DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L.* (chía)

Muestras de las semilla de <i>Salvia hispánica L.</i> (chía)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Porcentaje de humedad (%)	Promedio del porcentaje de humedad (%) de las tres muestras
Muestra 1	5.0063	4.7635	4.85	4.83
Muestra 2	5.0117	4.7714	4.80	
Muestra 3	5.0012	4.7591	4.84	

**Fuente:** Elaboración propia y datos obtenidos experimentalmente.

#### Análisis e Interpretación:

En la tabla N° 3, se observa el promedio del porcentaje de humedad de las semillas de *Salvia hispánica L.* (Chía) que es de 4.83% lo que indica que las semillas de Chía poseen un bajo contenido de agua en sus estructuras.

Según **Bartosik (2013)** <sup>(45)</sup>, mencionó que de este valor dependerá la conservación y calidad de las semillas, puesto al tener granos húmedos generaría un ambiente propicio para el desarrollo de hongos y bacterias, haciendo que la semilla no sea útil para su consumo. Así mismo **Gómez (2013)** <sup>(46)</sup>, mencionó que si el contenido de agua es alto en el aceite se observara niveles altos de acidez, peróxidos y ácido palmítico, lo cual tiene una influencia en la calidad de las semillas y el aceite.

Por otra parte, bases de datos de **USDA (2010)** <sup>(19)</sup>, reportan valores de humedad de 5.8 %, que es similar al determinado en el presente estudio.

## 4.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

### 4.2.1. Extracción del aceite de *Salvia hispánica L. (Chía)* en equipo de Soxhlet.

TABLA 4: DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA *Salvia hispánica L. (Chía)* EN EL EQUIPO DE SOXHLET

Muestras molidas de las semillas de <i>Salvia hispánica L. (chía)</i>	Peso de la semilla molida que entró en el equipo (peso inicial) (g)	Peso del aceite extraído en el equipo (peso final) (g)	Porcentaje de rendimiento de la extracción de cada muestra (%)	Promedio del porcentaje de rendimiento de la extracción de las 3 muestras (%)
Muestra 1	20	5.9322	29.66	27.47
Muestra 2	20	5.8478	29.24	
Muestra 3	20	4.7000	23.50	

Fuente: Elaboración propia y datos obtenidos experimentalmente.

### 4.2.2. Extracción del aceite de *Salvia hispánica L. (chía)* en el extractor de fluido supercríticos (FSC)

TABLA 5: DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE *Salvia hispánica L. (Chía)* EN EL EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (FSC)

Muestras molidas de las semillas de <i>Salvia hispánica L. (chía)</i>	Peso de la semilla molida que entró en el equipo (peso inicial) (g)	Peso del aceite extraído en el equipo (peso final) (g)	Porcentaje de rendimiento de la extracción de cada muestra (%)	Promedio del porcentaje de rendimiento de la extracción de las 3 muestras (%)
Muestra 1	8.0296	2.6381	32.85	30.02
Muestra 2	8.0555	2.1100	26.77	
Muestra 3	8.1289	2.4736	30.43	

Fuente: Elaboración propia y datos obtenidos experimentalmente.

### Análisis e Interpretación:

En la tabla N° 4 y 5, se muestra el porcentaje de rendimiento de la extracción del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L. (Chía)*, que se realizó por dos métodos: equipo de extracción de Soxhlet usando como solvente hexano y por el

extractor de fluidos supercríticos (FSC) modelo MV10-waters con CO<sub>2</sub> a condiciones supercríticas.

En conclusión el porcentaje de rendimiento fue mayor usando el equipo de fluidos supercríticos obteniéndose un 30.02 % comparando con el equipo de extracción de Soxhlet en el cual se obtuvo un 27.47 %.

Por lo cual se puede decir que el equipo de FSC es mucho mejor para la extracción de aceites frente a la extracción con Soxhlet teniéndose así muchas ventajas puesto que en la extracción con Soxhlet utiliza solventes como el hexano esto deja un residuo inherente en el aceite, en cambio en FSC el aceite puede ser extraído sin solventes pues se utiliza CO<sub>2</sub> supercrítico que no es tóxico y está libre de residuos, así también el tiempo de extracción pues es mucho menor por FSC que por el equipo de Soxhlet, por las ventajas mencionadas se utilizó para los diferentes procedimientos el aceite de chía extraída por el equipo de Fluidos Supercrítico. **Salguero (2007)** <sup>(47)</sup>, llegó a la misma conclusión en que el tiempo de extracción es mucho menor en el equipo de FSC a comparación de la extracción por solvente.

Este rendimiento obtenido se puede decir que son similares a los descritos por **Jiménez (2013)** <sup>(10)</sup>, que reportó un rendimiento de 27.9 %, también **Ixtaina (2010)** <sup>(11)</sup>, reportó el porcentaje de rendimiento d las semillas de Argentina y Guatemala de 20.3-33.6 % y según **Sánchez (2012)** <sup>(48)</sup>, reportó el porcentaje de rendimiento de la linaza que tiene un 30-40 % de aceite y del Sacha Inchi que tiene un rendimiento de aceite de 35-45 % siendo mayor al de la chía.

#### 4.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L.* (CHIA)

TABLA 6: RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ACEITE DE *Salvia hispánica L.* (Chía)

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS			Valores de referencia según CODEX
CONSTANTES	ACEITE	UNIDAD	
Densidad	0.925	g/ml	-----
Índice de refracción	1.482	-----	-----

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS			Valores de referencia según CODEX
CONSTANTES	ACEITE	UNIDAD	
Índice de acidez	1.03	mg de KOH/100g de aceite	Máximo 4 mg de KOH/100g de aceite
Índice de yodo	189.08	g de yodo/100g de aceite	-----
Índice de peróxidos	5.7	meq O <sub>2</sub> activo/kg de aceite	Máximo 10 meq O <sub>2</sub> activo/kg de aceite
Índice de saponificación	184.30	mg KOH/100g de aceite	-----

**Fuente:** Elaboración propia y datos obtenidos experimentalmente.

### Análisis e interpretación:

En la tabla N° 6, se observa los resultados de las características fisicoquímicas del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), los resultados de la densidad junto con el índice de refracción nos dará información de la pureza de un aceite y de la calidad de la misma según **Paucar (2013)** <sup>(33)</sup>.

Los resultados para el índice de peróxido y de acidez se puede considerar un aceite muy aceptable estos valores se encuentran por debajo de los considerados como requisitos de calidad para aceites establecidos por el **CODEX** <sup>(49)</sup>, que son 10 meq/kg de aceite y 4 mg de KOH/100g de aceite respectivamente. **Salazar (2004)** <sup>(50)</sup>, indicó que el valor de la acidez, indica la presencia de una baja concentración de ácidos grasos libres.

En cuanto al índice de yodo es una propiedad química relacionada con la instauración, que al observar nuestros resultados podemos decir que el aceite posee una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados como se observa en la tabla N°10. **Paucar (2013)** <sup>(33)</sup>, indicó que el índice de saponificación es una medida aproximada del peso molecular promedio de los ácidos grasos. Aunque no se encontraron valores de referencia para la densidad, índice de refracción, índice de yodo y saponificación, estos valores del aceite de chía se compararon con los valores reportados por **Ixtaina (2010)** <sup>(11)</sup>, para el aceite de las semillas de chía de Argentina y Guatemala estos valores son, índice de yodo 190 - 215.0,

índice de acidez 2.05, índice e saponificación 193.09 - 193.01, índice de refracción 1.4786-1.4781 e índice de peróxido  $1.84 \pm 0.6 - 2.19 \pm 0.8$ , como se observan algunos valores son similares y otros ligeramente elevados, también se comparó con otras semillas oleaginosas con los reportados por **Pantoja (2012)** <sup>(51)</sup>, del aceite de sacha Inchi, que tiene una densidad de 0.926, IR 1.478, índice de yodo 183, índice de saponificación de 192, índice de acidez de 1, **Arilmi (2010)** <sup>(52)</sup>, reportó IR (1.480; 1.470), densidad (0.9269; 0.931), índice de acidez (0.231; 0.304), índice de yodo (194.035; 188.707), índice de saponificación (184.748; 197.976), índice de peróxidos (0.889; 0.396), esto en el caso de Sacha Inchi y linaza respectivamente, estas se encuentran en las unidades mencionadas en la tabla N° 6 . Los resultados reportados por los autores mencionados son similares a los resultados obtenidos del aceite de chía.

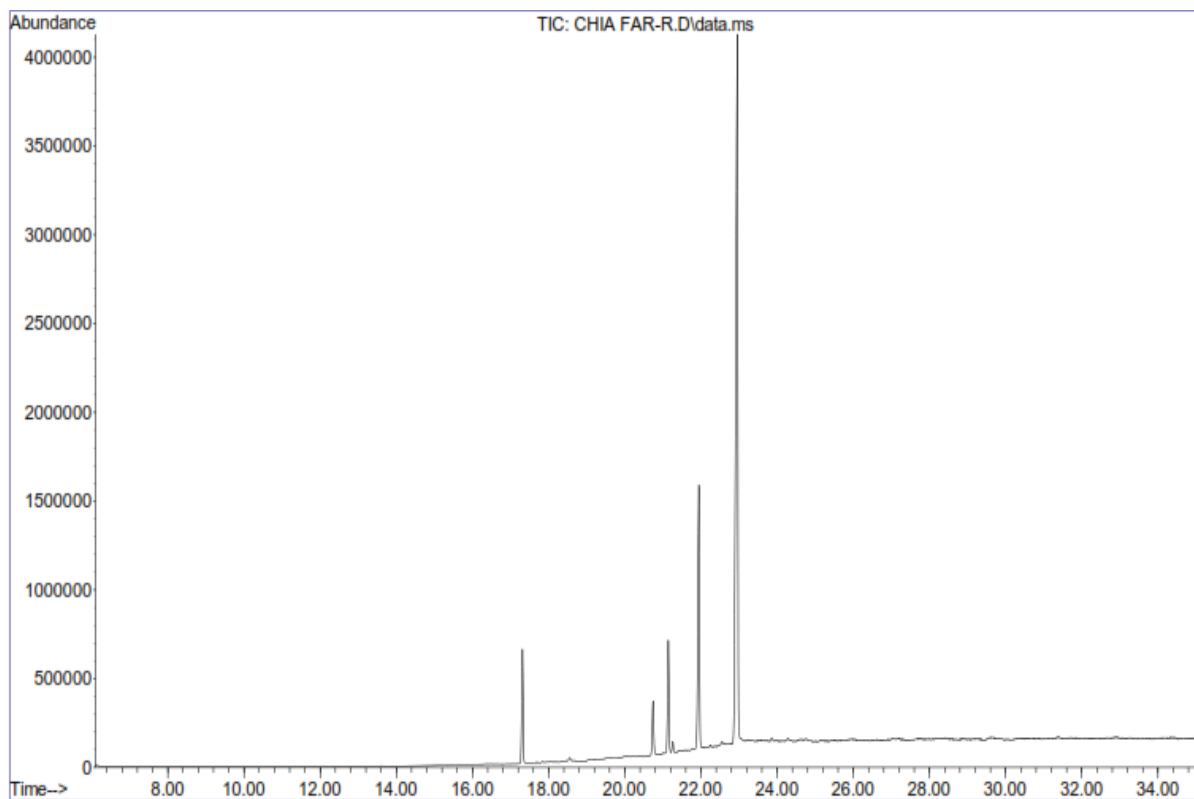
#### 4.4. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

TABLA 7: CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS EN EL ACEITE DE *Salvia hispánica L.* (Chía)

ÁCIDOS GRASOS	TIEMPO DE RETENCIÓN	CONCENTRACIÓN (%)
Ácido Palmítico	17.313	6.91
Acido Esteárico	20.744	3.61
Ácido Oleico (Omega 9)	21.141	7.07
Ácido Linoleico (Omega 6)	21.946	18.74
Ácido Linolénico (Omega 3)	22.952	62.98

**Fuente:** Elaboración propia y datos obtenidos experimentalmente.

GRÁFICO 1: PERFIL CROMATOGRÁFICO (GC-MASAS) DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L.* (chía).



**Fuente:** Laboratorio de Química UNSAAC

### **Análisis e Interpretación:**

En la tabla N° 7, se observa el perfil de ácidos grasos del aceite de chía, que se extrajo en el equipo de Fluidos Supercríticos, donde la presencia de ácido linolénico (omega 3) está en una abundancia del 62.98 % a los 22.95 minutos. El ácido linoleico (omega 6) se encontró en un 18.74 % a un tiempo de 21.95min, ácido oleico (omega 9) se encontró en 7.07 % a un tiempo de 21.14 min, el ácido esteárico se encontró en un 3.61 % a un tiempo de 20.74min, y el ácido palmítico se encontró en un 6.91 % a un tiempo de 17.31min.

En el grafico 1, se observa el cromatograma obtenido, en donde se muestra la abundancia versus el tiempo de retención de los ácidos grasos encontrados, donde se muestran cinco picos cromatográficos, los cuales según **Frank (2002)** <sup>(31)</sup>, se confirma por comparación de sus espectros de masas, con los espectros de los ácidos grasos almacenados en la librería de Fame DB23 y Nist 11.

El aceite de la chía como se observó posee un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, destacando la presencia de los ácidos grasos esenciales (linolénico y linoleico), estos valores concuerdan con los reportados del aceite de chía de Chile y Argentina como son por **Jimenez (2013)** <sup>(10)</sup>, **Ixtaina (2010)** <sup>(11)</sup>, **Ayerza (2006)** <sup>(18)</sup>, los valores reportados fueron para ácido linolénico (51.8, 64, 57-63 % respectivamente) y para ácido linoleico (27, 20, 18.7-19.5% respectivamente).

Al comparar nuestros resultados con el aceite de Sacha Inchi y linaza reportados por **Sánchez (2012)** <sup>(48)</sup>, se observó que los ácidos grasos presentes en mayor concentración también son el ácido linoleico (omega 6), en un 34.08 % y 14.4 % respectivamente, el ácido linolénico (omega 3), en un 50.41 % y 50.0 % respectivamente, los valores reportados por el autor son inferiores a excepción del ácido linoleico en Sacha Inchi que es mayor con respecto al aceite de chía.

La presencia de ácidos grasos poliinsaturados principalmente el omega 3 tiene un papel importante en la reducción del colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos, mas no se conoce el mecanismo de la reducción o no modificación del HDL-colesterol según **Nasiff (2009)** <sup>(53)</sup>.

El posible mecanismo es, que los AGPIs reducen la forma nuclear activa de SREBP-1. Segundo, los AGPIs disminuyen la estabilidad del mensajero de SREBP-1, y tercero suprimen la expresión del RNAm de SREBP-1. Por lo que dietas con alto contenido en AGPIs favorecerán la disminución de SREBP-1 y como consecuencia disminuirán la lipogénesis mencionó **Nasiff (2009)** <sup>(53)</sup>.



#### 4.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE

TABLA 8: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE LA PRUEBA “T” DEL PERFIL LIPÍDICO PARA EL GRUPO CONTROL NEGATIVO.

PERFIL LIPÍDICO		N	Media	Desviación típ.	T	P
CT	Colesterol total (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	66.67	4.49	-8.81	0.00
	Colesterol total (A los 15 días de suero fisiológico más dieta hiperlipídica)	6	78.44	7.33		
LDL	LDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	65.88	4.44	-8.75	0.00
	LDL - colesterol (A los 15 días de suero fisiológico más dieta hiperlipídica)	6	77.80	7.36		
HDL	HDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	48.13	10.80	3.72	0.01
	HDL - colesterol (A los 15 días de suero fisiológico más dieta hiperlipídica)	6	29.55	2.95		
TG	Triglicéridos (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	133.61	5.06	-4.46	0.01
	Triglicéridos (A los 15 días de suero fisiológico más dieta hiperlipídica)	6	142.15	0.47		

**Fuente:** Datos estadísticos.

**Leyenda:**

- CT = Colesterol total-
- LDL = Lipoproteínas de baja densidad.
- HDL = Lipoproteínas de alta densidad.
- TG = Triglicéridos.
- N = Numero de muestras.
- T = Estadístico de prueba
- P = Significancia.

#### **Análisis e Interpretación:**

En la tabla N°8, se observa el grupo control negativo, donde podemos ver que hubo diferencias significativas en los niveles de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos, lo cual puede deberse a la dieta administrada que fue rica en grasas saturadas lo que hizo que se incrementaran los niveles de colesterol total, LDL-colesterol ,triglicéridos y HDL-colesterol disminuyera.

Según el reporte de **Holguino (2010)** <sup>(29)</sup>, con respecto al grupo control que fue inducida con dieta rica en grasas saturadas y tratadas con suero fisiológico, se observó que hubo incremento en los niveles de colesterol total, triglicéridos y LDL-colesterol y disminución de HDL colesterol, los cuales concuerda con nuestros resultados.

Entonces se puede decir que en el grupo control negativo la dieta hiperlipídica rica en grasas saturadas tuvo efecto en la elevación de los niveles de colesterol y LDL-colesterol y triglicéridos.

**TABLA 9: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE LA PRUEBA “T” DEL PERFIL LIPÍDICO PARA EL GRUPO CONTROL POSITIVO (ATORVASTATINA 10 mg/kg).**

PERFIL LIPÍDICO		N	Media	Desviación típ.	T	P
CT	Colesterol total (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	66.43	22.56	2.00	0.10
	Colesterol total (A los 15 días de tratamiento con atorvastatina mas dieta hiperlipídica)	6	51.50	19.52		
LDL	LDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	75.64	20.28	1.37	0.22
	LDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con atorvastatina mas dieta hiperlipídica)	6	63.91	16.38		
HDL	HDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	39.11	5.50	-8.04	0.00
	HDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con atorvastatina mas dieta hiperlipídica)	6	48.98	5.12		
TG	Triglicéridos (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	151.61	8.13	6.54	0.00
	Triglicéridos (A los 15 días de tratamiento con atorvastatina mas dieta hiperlipídica)	6	137.45	4.87		

**Fuente:** Datos estadísticos

**Leyenda:**

- CT = Colesterol total-
- LDL = Lipoproteínas de baja densidad.
- HDL = Lipoproteínas de alta densidad.
- TG = Triglicéridos.
- N = Numero de muestras.
- T = Estadístico de prueba
- P = Significancia.

### **Análisis e Interpretación:**

En la tabla N° 9, se observa en el grupo control positivo los valores del colesterol total y del LDL-colesterol no presentan diferencias significativas, pero al observar las medias podemos decir que si hubo disminución en los niveles de colesterol total de 66.43mg/dl a 51.50mg/dl, como también en los niveles de LDL-colesterol que fue de 75.64mg/dl a 63.91mg/dl. y en los niveles de HDL-colesterol y triglicéridos si hubo diferencias significativas como se observa en los niveles de

triglicéridos disminuyó de 151.61mg/dl a 137.45mg/dl y el HDL-colesterol aumento de 39.11mg/dl a 48.98mg/dl.

Según **Velázquez (2005)** <sup>(5)</sup>, la atorvastatina es un medicamento ya estudiado y demostrado en disminuir los niveles de colesterol total, LDL-colesterol, lo cual si se observó que hubo disminución a pesar de que se continuo con la dieta hiperlipídica durante la administración de la atorvastatina.

**TABLA 10: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE LA PRUEBA “T” DEL PERFIL LIPÍDICO PARA EL GRUPO DE RATAS CON ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (Chía) A DOSIS DE (0.5 mL/kg)**

PERFIL LIPÍDICO		N	Media	Desviación típ.	t	P
CT	Colesterol total (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	64.07	21.18	-0.51	0.63
	Colesterol total (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 0.5mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	69.26	19.79		
LDL	LDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	63.31	21.05	-0.54	0.61
	LDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 0.5mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	68.71	19.65		
HDL	HDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	48.18	4.91	10.76	0.00
	HDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 0.5mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	27.91	2.72		
TG	Triglicéridos (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	142.21	4.49	-4.12	0.01
	Triglicéridos (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 0.5mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	151.92	4.07		

**Fuente:** Datos estadísticos

**Leyenda:**

- CT = Colesterol total-
- LDL = Lipoproteínas de baja densidad.
- HDL = Lipoproteínas de alta densidad.
- TG = Triglicéridos.
- N = Numero de muestras.
- T = Estadístico de prueba
- P = Significancia.

### **Análisis e interpretación:**

En la tabla N°10, se observa que en los niveles de colesterol total, LDL- colesterol no hubo diferencias significativas, pero si hubo un incremento ligero en estos niveles. En el HDL-colesterol y triglicéridos hubo diferencias significativas, al

observar las medias se ve que hubo disminución en los niveles de HDL-colesterol e incremento los niveles de triglicéridos.

Esto se puede deber a la poca dosis administrada que fue de 0.5ml/kg de peso, como también a la administración de la dieta hiperlipídica durante el tratamiento con el aceite de chía, según **Ibañez (2006)** <sup>(13)</sup>, en el estudio con el aceite de sachá Inchi también reporto que después del tratamiento a esta misma dosis incremento los niveles de colesterol total y triglicéridos, a excepción del HDL-colesterol.

Finalmente se puede decir que el aceite de chía a la dosis de 0.5 mL/kg no tuvo efecto en la disminución de los niveles de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos, ni en el incremento de los niveles de HDL-colesterol.

**TABLA 11: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE LA PRUEBA “T” DEL PERFIL LIPÍDICO PARA EL GRUPO DE RATAS CON ACEITE DE *Salvia hispánica L.* (CHÍA) A DOSIS DE (1 mL/kg)**

PERFIL LIPÍDICO		N	Media	Desviación típ.	t	P
CT	Colesterol total (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	76.26	9.94	0.71	0.51
	Colesterol total (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 1mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	72.85	15.59		
LDL	LDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas s con dieta hiperlipídica)	6	75.65	9.94	0.70	0.52
	LDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 1mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	72.33	15.51		
HDL	HDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	46.38	7.56	5.28	0.00
	HDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 1mL/kg /kg más dieta hiperlipídica)	6	19.84	6.14		
TG	Triglicéridos (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	145.41	8.66	-0.75	0.49
	Triglicéridos (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 1mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	149.33	17.10		

**Fuente:** Datos estadísticos

**Leyenda:**

- CT = Colesterol total-
- LDL = Lipoproteínas de baja densidad.
- HDL = Lipoproteínas de alta densidad.
- TG = Triglicéridos.
- N = Numero de muestras.
- T = Estadístico de prueba
- P = Significancia.

## Análisis e interpretación:

En la tabla N° 11, se observa que no hubo diferencias significativas con respecto a los valores de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos, aunque no fue significativo hubo una disminución ligera del colesterol total de 76.26 mg/dl a 15.59 mg/dl y en LDL-colesterol de 75.65 mg/dl a 72.33 mg/dl. En cuanto a los triglicéridos hubo un ligero incremento; en el HDL-colesterol hubo disminución significativa de estos niveles.

**Ibañez (2006)**<sup>(13)</sup>, en el estudio con el aceite de Sacha Inchi también reporto que después del tratamiento a esta misma dosis incrementó los niveles de colesterol total y LDL-colesterol en nuestro caso, aunque no fue significativo si hubo disminución de estos niveles.

Este resultado se puede deber a que la dosis del aceite administrado que fue de 1ml/kg de peso no fue una dosis suficiente, como también la dieta hiperlipídica administrada durante el tratamiento con el aceite de chía no contribuyeron a que haya una disminución significativa de los niveles de colesterol total, LDL-colesterol y triglicérido ni en el incremento de los niveles de HDL-colesterol.

**TABLA 12: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE LA PRUEBA “T” DEL PERFIL LIPÍDICO PARA EL GRUPO DE RATAS CON ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (Chía) A DOSIS DE (2 mL/kg)**

PERFIL LIPÍDICO		N	Media	Desviación típ.	t	P
CT	Colesterol total (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	81.74	19.86	6.25	0.00
	Colesterol total (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 2mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	52.49	11.89		
LDL	LDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	81.08	19.83	6.22	0.00
	LDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 2mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	52.06	11.83		
HDL	HDL - colesterol (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	39.28	4.65	6.52	0.00
	HDL - colesterol (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 2mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	26.18	2.00		
TG	Triglicéridos (A los 15 días de alimentarlas con dieta hiperlipídica)	6	149.34	4.07	5.83	0.00
	Triglicéridos (A los 15 días de tratamiento con el aceite de chía 2mL/kg más dieta hiperlipídica)	6	137.16	2.69		

**Fuente:** Datos estadísticos

## Leyenda:

- CT = Colesterol total-
- LDL = Lipoproteínas de baja densidad.
- HDL = Lipoproteínas de alta densidad.
- TG = Triglicéridos.
- N = Numero de muestras.
- T = Estadístico de prueba
- P = Significancia.

## Análisis e interpretación:

En la tabla N° 12, se observa que hubo diferencias significativas para el colesterol total, LDL-colesterol, HDL- colesterol y triglicéridos. En donde el colesterol total disminuyó de 81.74 mg/dl a 52.49 mg/dl; en los niveles de LDL-colesterol también disminuyó de 81.08 mg/dl a 52.06 mg/dl y en los niveles de triglicéridos también disminuyó de 149.34 mg/dl a 137.16 mg/dl, pero con respecto al HDL-colesterol se puede observar que no hubo incremento.

**Fernández (2006)** <sup>(13)</sup>, reportó que el aceite de chía disminuyó significativamente triglicéridos mas no colesterol total y no hubo diferencias en los valores de LDL-colesterol. **Ibáñez (2006)** <sup>(13)</sup>, reportó que a estas dosis el aceite de Sacha Inchi disminuyó los niveles de colesterol total, LDL-colesterol y HDL-colesterol (73.81-71.91; 37.90-35.27; 37.91-35.27 mg/dl respectivamente), en cuanto a los triglicéridos hubo un ligero incremento.

Se puede decir que el aceite de chía a la dosis de 2 ml/kg de peso más dieta hiperlipídica tuvo efecto en la disminución del colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos, esto puede deberse a que el aceite de chía posee un mayor porcentaje de ácidos grasos polinsaturados como el omega 3 y 6 como se observó en la Tabla N°7.

#### 4.5.1. ANÁLISIS DE VARIANZA UNIFACTORIAL DEL PERFIL LIPÍDICO

TABLA 13: ANOVA DE UN FACTOR

PERFIL LIPÍDICO		N	Media	Mínimo	Máximo
Colesterol total	Control Negativo (suero fisiológico)	6	11.78	5.10	13.13
	Control Positivo (atorvastatina 10mg/kg)	6	-14.93	-41.58	15.87
	Aceite de chía ( 0,5 ml/kg)	6	5.20	-27.21	29.97
	Aceite de chía (1 ml/kg)	6	-3.40	-13.76	14.13
	Aceite de chía (2 ml/kg)	6	-29.24	-40.47	-13.73
	Total	30	-6.12	-41.58	29.97
LDL - colesterol	Control Negativo (suero fisiológico)	6	11.91	5.10	13.31
	Control Positivo (atorvastatina 10mg/kg)	6	-11.72	-41.59	15.93
	Aceite de chía ( 0,5 ml/kg)	6	5.40	-26.67	30.02
	Aceite de chía (1 ml/kg)	6	-3.31	-13.69	14.25
	Aceite de chía (2 ml/kg)	6	-29.02	-40.26	-13.54
	Total	30	-5.35	-41.59	30.02
HDL - colesterol	Control Negativo (suero fisiológico)	6	-18.58	-33.12	-3.49
	Control Positivo (atorvastatina 10mg/kg)	6	9.87	6.86	14.43
	Aceite de chía ( 0,5 ml/kg)	6	-20.27	-24.98	-11.81
	Aceite de chía (1 ml/kg)	6	-26.54	-43.36	-12.70
	Aceite de chía (2 ml/kg)	6	-13.10	-19.82	-8.79
	Total	30	-13.72	-43.36	14.43
Triglicéridos	Control Negativo (suero fisiológico)	6	8.54	1.26	11.52
	Control Positivo (atorvastatina 10mg/kg)	6	-14.16	-18.17	-5.04
	Aceite de chía ( 0,5 ml/kg)	6	9.71	3.20	16.37
	Aceite de chía (1 ml/kg)	6	3.92	-11.51	19.84
	Aceite de chía (2 ml/kg)	6	-12.18	-17.24	-3.62
	Total	30	-0.84	-18.17	19.84

**TABLA 14: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL EFECTO HIPOLIPEMIANTE EN RATAS ALBINAS**

		<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Colesterol total	Inter-grupos	6407.544	4	1601.886	6.524	0.00
	Intra-grupos	6138.417	25	245.537		
	Total	12545.961	29			
LDL - colesterol	Inter-grupos	6111.531	4	1527.883	5.770	0.00
	Intra-grupos	6620.291	25	264.812		
	Total	12731.822	29			
HDL - colesterol	Inter-grupos	4727.344	4	1181.836	16.616	0.00
	Intra-grupos	1778.190	25	71.128		
	Total	6505.534	29			
Triglicéridos	Inter-grupos	3167.753	4	791.938	14.437	0.00
	Intra-grupos	1371.404	25	54.856		
	Total	4539.157	29			

**Fuente:** Datos estadísticos

Leyenda:

Anova : Análisis de Varianza

gl. : Grados de libertad

f : Distribución de Fisher

sig. : Significancia

**Análisis e Interpretación:**

En la tabla N° 13, se observa los promedios de la diferencia de los valores hallados después del tratamiento con los valores basales (después de la dieta hiperlipídica), se puede observar que para el colesterol total para el control negativo aumento en un promedio de 11.78 mg/dl, en cuanto a los demás grupos el promedio menor en que disminuyo el CT fue de 3.4mg/dl en el grupo de 1 mL/kg y mayor disminución fue de 29.2 mg/dl en el grupo de 2 ml/kg, con respecto al LDL-colesterol hubo una disminución menor en promedio de 3.31 en el grupo de 1 mL/kg y una mayor disminución en promedio de 29.02 mg/dl, en el HDL – colesterol hubo incremento mayor en promedio en 9.87 mg/dl en el grupo de atorvastatina y una disminución mayor en promedio 26.53 mg/dl en el grupo de 1ml/kg, en cuanto a los triglicéridos hubo una disminución menor en promedio de



12.17 mg/dl en el grupo de 2 mL/kg y una mayor disminución en promedio de 14.16mg/dl grupo de la atorvastatina.

En la tabla N° 14, nos muestra que existen diferencias significativas para el colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos, lo que indica que hubo aumento y disminución en el cual por el método de Duncan se observó en que grupos hubo diferencias significativas.

#### 4.5.2. DUNCAN PARA SUBCONJUNTOS

TABLA 15: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE DUNCAN PARA SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS EN EL COLESTEROL TOTAL.

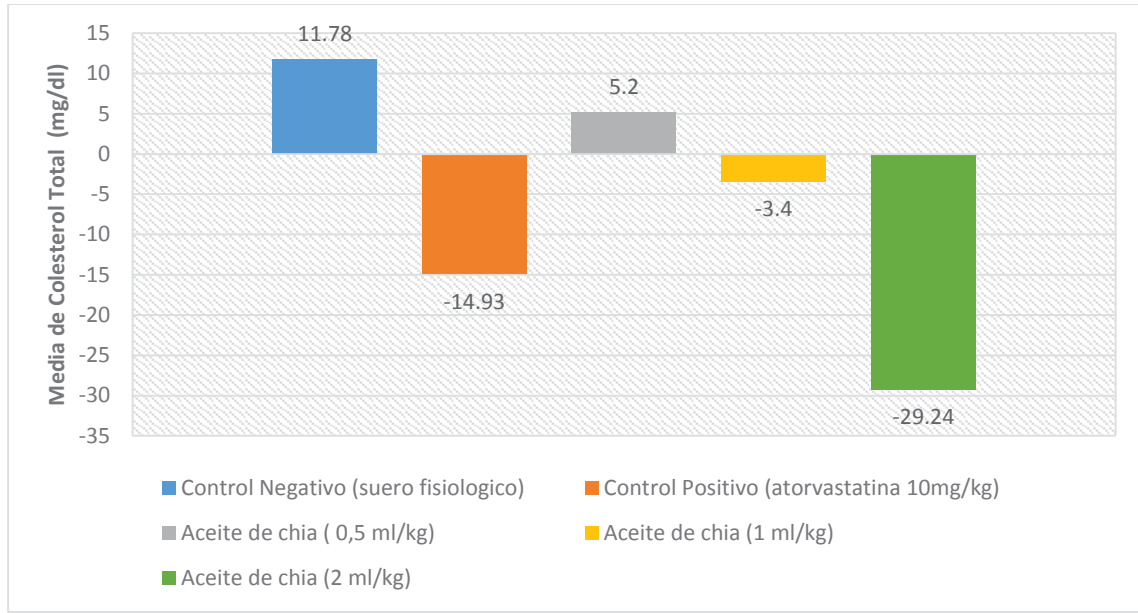
GRUPO DE RATAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Aceite de chía (2 mL/kg)	6	-29.2401		
Control Positivo (atorvastatina 10 mg/kg)	6	-14.9333		
Aceite de chía (1 mL/kg)	6		-3.4014	
Aceite de chía ( 0,5 mL/kg)	6			5.1953
Control Negativo (suero fisiológico)	6			11.7764
Sig.		0.126	1.000	0.124

Fuente: Datos estadísticos

#### Análisis e Interpretación:

En la tabla N°15, nos muestra que en la evaluación del efecto sobre el nivel de colesterol total, se formaron 3 subconjuntos homogéneos el primero constituido por el aceite de *Salvia hispánica L. (Chía)* a dosis de 2 mL/kg de peso y por el control positivo con atorvastatina 10 mg/kg de peso, lo cual indica que hubo el mismo efecto en la disminución del colesterol total y siendo un poco mayor con el aceite de chía a dosis de 2 mL/kg de peso, en el subconjunto 2 se observa solo al grupo del aceite de chía a dosis 1 mL/kg lo que indica que disminuyó el colesterol total pero en muy baja proporción, en cambio en el subconjunto 3 formado por el aceite de chía (0.5 mL/kg) y el control negativo que se le dio solo suero fisiológico se observa que hubo un incremento en los niveles de colesterol total siendo mayor en el grupo control negativo.

GRÁFICO 2: GRÁFICO PARA EL COLESTEROL TOTAL



Fuente: Datos estadísticos

### Análisis e Interpretación:

En la grafico N° 2, se observa que con respecto al grupo control negativo, que en el grupo control positivo hubo una disminución en promedio de 14,9 mg/dl en los niveles de colesterol total y una disminución mayor en el grupo del aceite de 2 mL/kg que bajo en 29.2 mg/dl, en el grupo del aceite de 1 mL/kg que bajo en promedio 3.4 mg/dl en cambio en el grupo del aceite de 0.5 mL/kg hubo un incremento en promedio de 5 mg/dl, al igual que el grupo control negativo que hubo un incremento de 11.78 mg/dl.

Así mismo se puede concluir que el aceite de chía a la dosis de 2 mL/kg de peso presento un mayor efecto en la disminución del colesterol total, esto se debe a la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados (ácido linolenico y linoleico), que según **Nasiff (2009)** <sup>(53)</sup>, contribuyen en la disminución del colesterol total junto a los esteroides presentes en el aceite.

**TABLA 16: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE DUNCAN PARA SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS EN EL LDL-COLESTEROL TOTAL.**

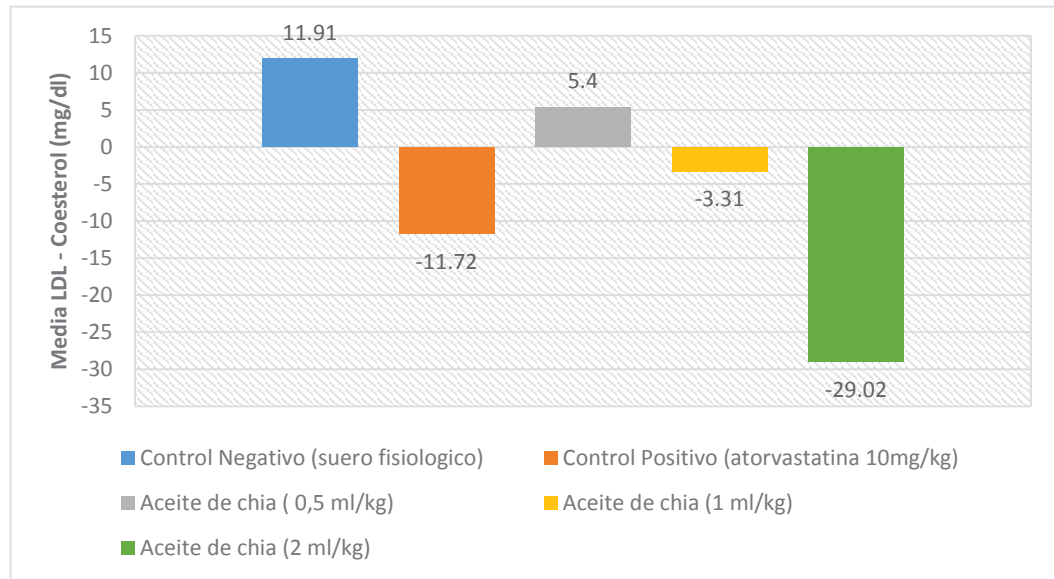
Grupo de Ratas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Aceite de chía (2 mL/kg)	6	-29.0192		
Control Positivo (atorvastatina 10 mg/kg)	6	-11.7204		
Aceite de chía (1 mL/kg)	6		-3.3122	
Aceite de chía (0,5 mL/kg)	6			5.4025
Control Negativo (suero fisiológico)	6			11.9128
Sig.		0.077	1.000	0.137

**Fuente:** Datos estadísticos

### **Análisis e Interpretación:**

En la tabla N° 16, nos muestra que en la evaluación del efecto sobre el nivel de LDL-colesterol, se formaron 3 subconjuntos homogéneos el primero constituido por el aceite de chía a dosis de 2 mL/kg de peso y el grupo control positivo con atorvastatina esto quiere decir que presentan el mismo efecto en la disminución del LDL- colesterol, en el subconjunto 2 solo está el aceite a dosis de 1ml/kg en la que hubo una ligera disminución, en el subconjunto 3 se observa que esta el grupo del aceite a 0.5 mL/kg y el control negativo con suero fisiológico presentan el mismo efecto incrementando los niveles de LDL-colesterol siendo en menor proporción con el aceite de chía de 0.5 mL/kg.

GRÁFICO 3: GRÁFICO PARA LDL-COLESTEROL.



Fuente: Datos estadísticos

### Análisis e Interpretación:

En la figura N° 3, se observa con respecto al grupo control negativo, que los grupos control positivo, del aceite a 1 y 2 mL/kg hubo una disminución en promedio de 11.7; 3.3 y 29 mg/dl en los niveles de LDL-colesterol, en cambio en el grupo del aceite a 0.5 mL/kg hubo incremento en promedio de 5.4 mg/dl con respecto a los demás grupos, pero al comparar con el grupo control negativo se podría decir que hubo una disminución ligera.

Así mismo se puede concluir que el aceite de chía a la dosis de 2 mL/kg de peso presento un mayor efecto en la disminución del LDL-colesterol, se puede decir que los ácidos grasos como el omega 3 y 6 tienen un papel importante en la disminución, aunque todavía no se conoce el mecanismo exacto por el cual actúa, según **Nasiff (2009)** <sup>(53)</sup>.

**TABLA 17: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DE DUNCAN PARA SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS EN EL HDL-COLESTEROL TOTAL.**

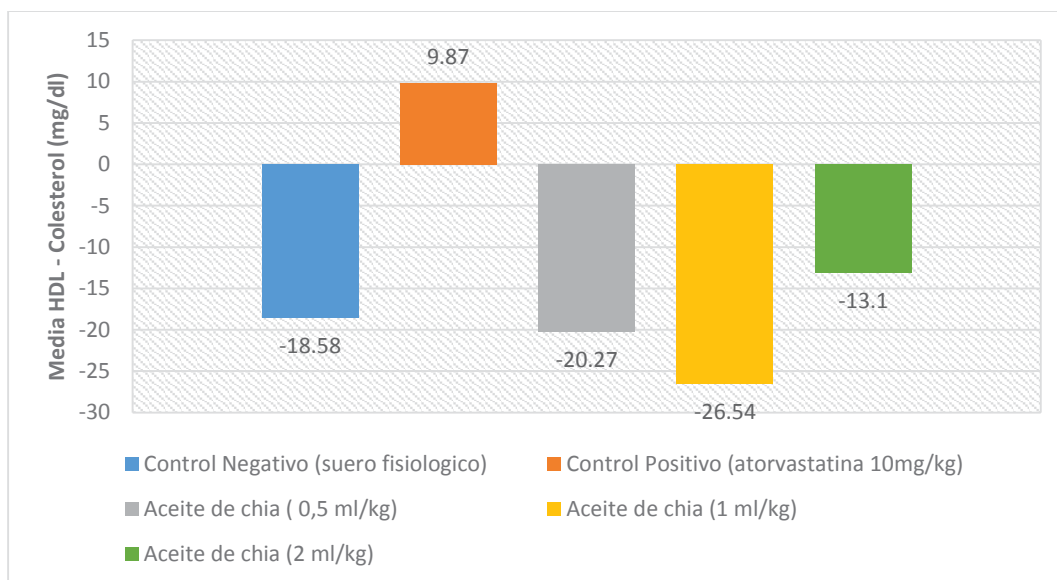
GRUPO DE RATAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Aceite de chía (1 mL/kg)	6	-26.5384		
Aceite de chía (0,5 mL/kg)	6	-20.2723		
Control Negativo (suero fisiológico)	6	-18.5764		
Aceite de chía (2 mL/kg)	6		-13.1038	
Control Positivo (atorvastatina 10 mg/kg)	6			9.8741
Sig.		0.134	1.000	1.000

**Fuente:** Datos estadísticos

### **Análisis e Interpretación:**

En la tabla N° 17, nos muestra que en la evaluación del efecto sobre el nivel de HDL-colesterol, se formó 3 subconjuntos homogéneos el primero formado por los grupos de control negativo, del aceite a 0.5 y 1 mL/kg presentan un mismo efecto esto quiere decir que disminuyeron los niveles de HDL-colesterol, el segundo subconjunto formado solo por el grupo del aceite de 2 mL/kg se observa también que hubo disminución en menos proporción y el tercer subconjunto solo conforma el grupo de control positivo el cual incremento los niveles de HDL-colesterol. Se puede concluir que la atorvastatina incrementa los niveles de HDL-colesterol y el aceite de chía no tiene efecto sobre el HDL-colesterol.

GRÁFICO 4: GRÁFICO PARA HDL-COLESTEROL.



Fuente: Datos estadísticos

### Análisis e Interpretación:

En la gráfico N° 4, observamos que hubo un incremento en el grupo control positivo (atorvastatina) en los niveles de HDL-colesterol en promedio de 9.9 mg/dl y una disminución en los grupos tratados con el aceite de chía a las dosis de 0.5, 1 y 2

mL/kg de peso al igual que el grupo negativo.

No se conoce el mecanismo por el cual ocurre La reducción de los niveles de HDL, según **Nasiff (2009)** <sup>(53)</sup>, sugiere que puede deberse a la dosis que a mayor dosis puede haber una mayor reducción.

Así mismo se puede concluir que el aceite de chía a las dosis de 0.5, 1 y 2 mL/kg de peso, no presentó efecto en el incremento del HDL-colesterol.

**TABLA 18: ANÁLISIS POR EL MÉTODO DUNCAN PARA SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS EN LOS TRIGLICÉRIDOS.**

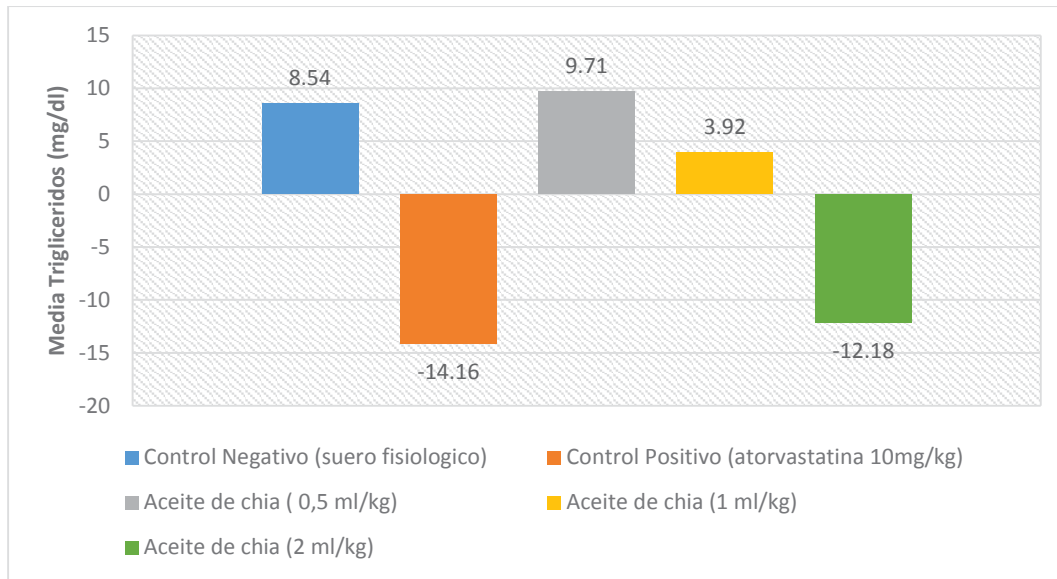
GRUPO DE RATAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control Positivo (atorvastatina 10 mg/kg)	6	-14.1641	
Aceite de chía (2 mL/kg)	6	-12.1798	
Aceite de chía (1 mL/kg)	6		3.9175
Control Negativo (suero fisiológico)	6		8.5405
Aceite de chía ( 0,5 mL/kg)	6		9.7056
Sig.		0.647	0.213

**Fuente:** Datos estadísticos

#### **Análisis e Interpretación:**

En la tabla N° 18, se muestra que se formaron 2 subconjuntos homogéneos. Los primeros constituidos por el aceite de chía (2 mL/kg) y control positivo atorvastatina a dosis de 10 mg/kg, esto quiere decir que ambos poseen el mismo efecto disminuyendo los niveles de triglicéridos a nivel sanguíneo, el segundo subconjunto formado por el control negativo (suero fisiológico) y el aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) a dosis 1 y 0.5 mL/kg, también podemos decir que presentan el mismo efecto, pues incrementan los niveles de triglicéridos.

GRÁFICO 5: GRÁFICO PARA TRIGLICÉRIDOS



Fuente: Datos estadísticos

### Análisis e Interpretación:

En la grafico N°5, se observa que en el grupo control negativo respecto a los niveles de triglicéridos que hubo una mayor disminución en el grupo control positivo (atorvastatina) y en el grupo del aceite de la chía a dosis de 2 mL/kg en promedio de 14.2 y 12.2 mg/dl respectivamente, en cambio al comparar el grupo control negativo con el aceite a dosis de 0.5 mL/kg se observa que hubo un incremento en promedio de 9.7 mg/dl y al comparar con el aceite de 1 mL/kg con respecto al control negativo se observa que hubo una ligera disminución en promedio de 3.9 mg/dl en los niveles de triglicéridos.

La disminución de triglicéridos se debe a los ácidos grasos omega 3 y omega 6, que según **Nasiff (2009)** <sup>(53)</sup> y **Rodriguez (2005)** <sup>(54)</sup>, el posible mecanismo con el cual actúa es mediante la reducción de la síntesis hepática de triglicéridos, el incremento de su aclaramiento plasmático y a través de receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR).

Así mismo se puede concluir que el aceite de chía a la dosis de 2 mL/kg de peso, presento un mayor efecto en la disminución de triglicéridos al igual que la atorvastatina.



## 4.6 DE LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA

TABLA 19: MORTALIDAD Y SUPERVIVENCIA CON EL ACEITE DE *Salvia hispánica L.* (CHÍA)

Grupos	N° de animales	Dosis (ml/kg)	N° de muertes	N° de vivos
N° 1	4	4	0	4/4
N° 2	4	8	0	4/4
N° 3	4	16	0	4/4
N° 4	4	32	0	4/4
N° 5	4	64	0	4/4
N° 6	4	96	1	3/4
N° 7	4	128	3	1/4

**Fuente:** Elaboración propia

### Análisis e interpretación:

En la tabla N°19, nos muestra que no hubo mortalidad de ratones a las dosis administradas de 4, 8, 16, 32 y 64 mL/kg de peso, en cambio a la dosis de 96 y 128 mL/kg de peso si se reportó muertes como se muestra en la tabla.

Según **Ibáñez (2006)** <sup>(13)</sup>, reportó datos similares con el aceite de Sacha Inchi que a la dosis de 96 y 128 mL/kg de peso, hubo muertes de 2/6 y 4/6 respectivamente.

Los fenómenos observados a las dosis administradas después de 30 minutos fueron que en las dosis de 4, 8, 16, 32 mL/kg de peso no se presentó ningún comportamiento anormal estaban activos, apetito normal, en la dosis de 64 mL/kg de peso se mostró una ligera disminución de apetito, en la dosis de 96 mL/kg de peso hubo disminución de apetito, somnolientos, actividad motora disminuida, y un poco de emesis y a la dosis de 128 mL/kg de peso hubo pérdida total de apetito, hipoactivos, espasmos musculares un poco de emesis y a las 24 horas en las dosis de 4,8,16,32,64 mL/kg de peso no se presentó ningún comportamiento anormal con apetito conservado y actividad motora normal, en las dosis de 96 y 128 mL/kg de peso se observó disminución del apetito, actividad motora disminuida, somnolencia, diarrea y vómitos. En las dosis de 96 y 128 mL/kg de peso hubo muertes al segundo, tercero, sexto y séptimo día, de iniciar la administración del aceite de chía, presentándose unas horas antes distensión abdominal, diarrea, vómitos, pérdida total del apetito, taquicardia y perdida del equilibrio.

Las muertes reportadas puede deberse al consumo excesivo del aceite en sí, pues según **Scacchi (2012)** <sup>(60)</sup>, mencionó que una dieta alta en grasas ya sea de origen animal o aceites vegetales, puede conducir a una moderada hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en la mayoría de las cepas de ratas y ratones, también puede aumentar la presión arterial sistólica y la disfunción endotelial, lo cual puede haber sido las causas de las muertes de los ratones.

**TABLA 20: VARIACIÓN DEL PESO SEGÚN DOSIS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L.* (Chía)**

Dosis ml/kg	Peso			
	Inicial	Tercer día	Séptimo día	Variación de pesos (%)
<b>BLANCO</b>	28.18	29.95	33.05	+ 14.75
<b>4</b>	29.28	31.7	32.3	+ 9.37
<b>8</b>	26.18	27.675	29.98	+ 12.68
<b>16</b>	28.95	31.9	30.63	+ 5.47
<b>32</b>	26.8	28.725	29.63	+ 9.54
<b>64</b>	27.93	28.025	30.02	+ 6.99
<b>96</b>	34.45	30.375	30.98*	- 10.07
<b>128</b>	30.43	29.95	21.55**	- 29.18

**Fuente:** Elaboración Propia

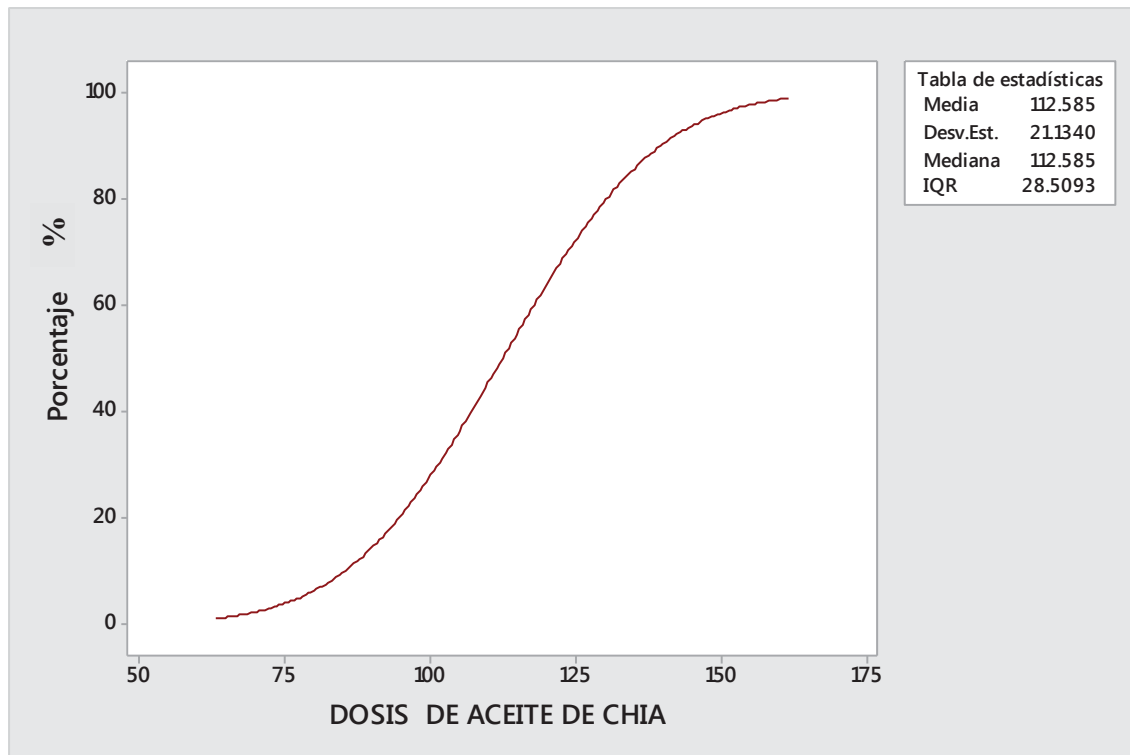
\*Solo tres animales

\*\*Solo un animal

### **Análisis e interpretación:**

En la tabla N° 20, se observa la variación de pesos de los ratones sometidos a diferentes dosis de aceite de Chía, viéndose que, a las dosis de 4, 8, 16, 32 y 64 mL/kg de peso hubo un incremento de pesos con respecto al peso inicial, en cambio a las dosis de 96 y 128 mL/kg de peso disminuyeron los pesos con respecto al inicial esto puede deberse a la presencia de diarrea a estas dosis. En el grupo blanco se observa un incremento de peso de 14.75 % siendo este mayor con respecto a las demás dosis en las cuales también hubo un incremento.

GRÁFICO 6: DETERMINACIÓN DE LA DL50 DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L. (Chía)*



Fuente: Datos estadísticos

#### Análisis e interpretación:

En el gráfico N° 6, se observa la determinación de la dosis letal media para el aceite de *Salvia hispánica L.* chía, se obtuvo mediante el método estadístico del programa *Probit* y el software estadístico *Minitab*, en el cual se determinó que la dosis letal media es de 112.585 mL/kg de peso, comparando con el dato de **Ibáñez (2006)** <sup>(13)</sup>, donde la DL50 para el aceite de Sacha Inchi fue de 111.649 mL/kg de peso, se observa que es menor con respecto al aceite de chía.

#### 4.7. DE LA DETERMINACIÓN DE LA ABSORCIÓN APARENTE DEL ACEITE EN TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS RATAS DE EXPERIMENTACIÓN

TABLA 21: RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA GRASA ABSORBIDA APARENTE

Muestras de heces	Peso total de heces en 48h (g)	Aceite obtenido de heces en 48h (g)	Porcentaje de absorción aparente (%)
Blanco	7.4186	0.155	
R1	6.1291	0.145	100
R2	7.5516	0.194	98.05
R3	7.1141	0.174	99.05
R4	7.2216	0.149	100
Promedio			<b>99.5</b>

Fuente: Elaboración Propia

##### Análisis e Interpretación:

Se observa en la tabla N° 21, que el porcentaje de absorción aparente del aceite de *Salvia hispánica L. (Chía)*, en la que se puede decir que de 2 g de aceite de chía administrada por vía oral en 48h tiene una absorción aparente en promedio de 99.5 %.

Según **García (2007)** <sup>(55)</sup>, la absorción de grasas es un proceso muy eficiente de tal manera que aproximadamente el 95 % de los lípidos de la dieta son absorbidos a nivel intestinal, lo cual explica la absorción casi completa del aceite de chía.

#### 4.8. DE LA INFLUENCIA DE LA BILIS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. CHIA

TABLA 22: RESULTADOS DE LA INFLUENCIA DE LA BILIS Y LA PANCREATINA EN LA HIDRÓLISIS DEL ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (CHÍA).

MUESTRA	TIEMPO (min.)	VOLUMEN GASTADO DE NAOH 0.1N(ml)	% DE HIDRÓLISIS
Aceite +bilis+ pancreatina 1%	15	0.6	0
Aceite+bilis+ pancreatina 1%	30	1	2.22
Aceite+bilis+ pancreatina 1%	45	1.1	2.78
Blanco(Aceite+bilis+ pancreatina (inactiva) caliente a ebullición 3min)	45	0.6	0

Fuente: Elaboración Propia

##### Análisis e Interpretación:

Como se observa en la tabla N°22, el porcentaje de hidrólisis de los lípidos es mayor a medida que pase el tiempo como se ve a los 15 minutos no se observa que haya hidrólisis y a los 30 minutos si hay hidrolisis y a los 45 minutos es un poco mayor el porcentaje de hidrólisis.

Según **FAO (1997)** <sup>(56)</sup>, mencionó que las grasas en el intestino delgado se mezclan con la bilis y posteriormente se emulsionan esta emulsión es tratada por la lipasa pancreática segregada por el páncreas, cual es responsable de la mayor parte del hidrólisis y del fraccionamiento de los ácidos grasos lo cual facilita la absorción de estos en la pared intestinal según **García (2007)** <sup>(55)</sup>.

#### 4.9. DE LA INFLUENCIA DEL pH GASTROINTESTINAL, EN LA EMULSIÓN DEL ACEITE DE *Salvia hispánica L. (chía)*.

CUADRO 8: INFLUENCIA DEL pH GASTROINTESTINAL EN LA EMULSIÓN DEL ACEITE DE *Salvia hispánica L. (Chía)*.

pH	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Aceite 2MI	+--	+--	+--	+--	+--	+--	+--
Aceite 2mL más 1mL de bilis	++-	++-	+++	+++	++-	++-	++-

**Fuente:** Elaboración Propia

Leyenda:

+++ = Muy Buena

++- = Buena

+-- = Regular

--- = Mala

#### **Análisis e Interpretación:**

En el cuadro N°8, se observa la influencia del pH sobre el aceite de chía en lo cual se simulo rangos de pH, tomando los valores del estómago e intestino delgado del animal de experimentación.

Los resultados que obtuvimos fue que el aceite de chía al mezclar con la solución a diferentes pH de 2-5, sin un agente emulsificante, no hay una buena emulsión y al comparar con el aceite mezclado con la solución a diferentes pH, más un agente emulsificante (bilis), se observa que hubo una mayor emulsión del aceite en los pH de 3-4 y una buena emulsión en los pH de 2,2.5-4.5 y 5.

Esto quiere decir que solo el pH tiene una baja influencia sobre la emulsión del aceite, para que el aceite tenga una mayor emulsión requiere de la presencia de agentes emulsificante como la bilis según la **FAO (1997)**<sup>(56)</sup>.

#### 4.10. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (chía) EN EL ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO DE LAS RATAS DE EXPERIMENTACIÓN.

CUADRO 9: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DEL ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (Chía).

ÓRGANO		2 HORAS	4 HORAS	8 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
ESTOMAGO	S.F.	---	---	---	---	---
	aceite	+++	+++	++-	---	---
INTESTINO	1 parte	+++	+++	++-	+--	---
	2 parte	+++	+++	+--	++-	---
	3 parte	---	+--	---	---	---
	4 parte	---	+--	---	---	---

**Fuente:** Elaboración Propia

#### LEYENDA:

- +++ Presente en abundante cantidad
- ++- Presente en mediana cantidad
- +-- Presente en mínima cantidad
- Ausente

#### Análisis e interpretación:

Se observa en el cuadro N° 9, los resultados de la presencia del aceite de chia en el estómago e intestino delgado, el cual fue dividido en 4 partes para una mejor observación. De esto se puede decir que en el animal de experimentación al cual se le administró solo suero fisiológico no se observó la presencia de aceite durante las 24 horas tanto en el estómago e intestino a comparación de las ratas que se les administró el aceite en donde se observó que en el estómago hubo presencia del aceite hasta las 8 horas, siendo más abundante las primeras cuatro horas desde la administración del aceite; en cambio en el intestino delgado, en la primera y segunda parte se observó la presencia del aceite en abundante cantidad en las primeras cuatro horas, el cual fue disminuyendo con el transcurso de las horas pues se observó en una mínima cantidad la presencia del aceite en la tercera y cuarta porción, es así que a las 24 horas ya no hay presencia del aceite de chia en el estómago y en ninguna porción intestino delgado. (Fotografías N° 36-47)

Esto se debe a que la digestión de los lípidos comienza en el estómago con la lipasa gástrica y supone el 10% del total de la digestión de los lípidos y los

productos resultantes son vertidos al intestino delgado donde ocurre la digestión de las grasas de forma mayoritaria y en donde el 95% de los lípidos de la dieta son absorbidos según **García (2007)** <sup>(55)</sup>.



## CONCLUSIONES

1. Se evaluaron las características fisicoquímicas, la toxicidad aguda y se determinó el efecto hipolipemiante del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), cultivadas en el distrito de Mollepata-Anta-Cusco.
2. Se extrajo el aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), usando dos equipos de extracción, el equipo de Soxhlet en el cual el porcentaje de rendimiento en promedio fue de 27.47 %, y en el extractor por fluidos supercríticos se obtuvo un mayor porcentaje de rendimiento que fue en promedio de 30.2 %.
3. Se determinaron cuantitativamente las características fisicoquímicas del aceite de *Salvia hispánica L.* (chía), los valores obtenidos fueron de la densidad de 0.925 g/ml, índice de refracción de 1.482, , índice de yodo de 189.08 g de yodo/100g de aceite, índice de saponificación de 184.30 mg KOH/100g de aceite, índice de acidez de 1.03 mg de KOH/100g de aceite y el índice de peróxidos de 5.7 meq O<sub>2</sub> activo/kg de aceite, estos dos últimos valores se encuentran dentro de los parámetros regidos por la norma Codex.
4. Se determinó el perfil de ácidos grasos del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, hallándose en mayor concentración el ácido linolénico (omega 3) en 62.98 %, ácido linoleico (omega 6) en 18.74 %, ácido oleico en 7.07 %, ácido esteárico 3.61 % y ácido palmítico en 6.91 %.
5. Se evaluó la toxicidad aguda, del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) y es prácticamente inocuo en ratones administrados por vía oral; La DL50 es de 112.585 mg/kg de peso.
6. Se evaluó el efecto hipolipemiante del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), donde se observó que el aceite de chía a la dosis de 2 mL/kg de peso, fue estadísticamente significativo en la reducción de los

niveles séricos de colesterol total en promedio en 29.24 mg/dl, LDL-colesterol en 29.01 mg/dl y triglicéridos en 12.18 mg/dl, mas no teniendo efecto en el incremento de los niveles de HDL-colesterol.

7. Se evaluó y comparó el efecto hipolipemiante del aceite las semillas *Salvia hispánica L.* (chía), a dosis de 0.5, 1 y 2 mL/kg, viéndose que a la dosis de 2 mL/kg se tuvo una mejor disminución significativa, en los niveles séricos de colesterol total de 29.24 mg/dl, LDL- colesterol de 29.02 mg/dL, triglicéridos de 12.18 mg/dL, pero no hubo un aumento en los niveles de HDL – Colesterol como se esperaba sino una disminución de 13.1 mg/dL.
8. Se comprobó “in vitro” la influencia de los diferentes pH del tracto gastrointestinal de la rata de experimentación, en la emulsión del aceite de *Salvia hispánica L.* (chía), donde se observó que el pH sin un agente emulsificante no influye significativamente en la emulsión del aceite de chía.
9. Se determinó cuantitativamente la absorción aparente del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), en el tracto gastrointestinal de los animales de experimentación, obteniéndose un 99.5 % de absorción aparente del aceite de chía en el tracto gastrointestinal de la rata de experimentación.
10. Se determinó la presencia del aceite de *Salvia hispánica L.* (chía), a diferentes horas en el estómago e intestino delgado de los animales de experimentación, mediante la observación en el microscopio, donde a las primeras ocho horas hubo presencia del aceite en el estómago e intestino delgado y a las 24 horas no se observó la presencia del aceite en el estómago e intestino delgado.
11. Se determinó la influencia de la bilis en la hidrólisis enzimática del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), donde se observó que la bilis

junto a enzimas pancreáticas influyen en la hidrólisis del aceite de chía, a un tiempo mayor de 15 minutos.

# RECOMENDACIONES

## A LOS DIRECTIVOS DE LA ESCUELA PROFESIONAL:

- Implementar los laboratorios con equipos de última generación como de fluidos supercríticos y HPLC, que sean accesibles a los alumnos y facilite las investigaciones.

## A LOS DOCENTES:

- Se sugiere a los docentes, los estudios de protocolos de investigación en farmacología y farmacocinética más ampliamente ya sean experimentales y no experimentales y así obtener un amplio conocimiento en la elaboración de trabajos de investigación.

## A LOS ESTUDIANTES:

- Ampliar la evaluación farmacológica de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), ya que se le atribuyen otras propiedades farmacológicas como hipoglucemiante, antioxidante, etc.
- Mejorar y llevar el aceite a una forma farmacéutica adecuada, para una mejor biodisponibilidad del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía), dentro del organismo.
- Extender dicha información a dosis mayores de 2 mL/kg de peso, para ver si tiene efecto sobre el HDL-colesterol a otras dosis.
- Hacer seguimiento del perfil lipídico en pacientes con hiperlipidemias que ya consumen el aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (chía).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades no transmisibles. Ginebra: OMS; 2015. Centro de prensa.
2. Sapio D. O.; Bueno M.; Busilacchi H.; Severin C. *Revista Agro Mensajes*. Publicación Cuatrimestral; 2008. Revisado el 14/05/15. Disponible en internet: <<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/24/3AM24.htm>>
3. Organización Mundial de la Salud. Nuevas directrices para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Ginebra: OMS; 2004. centro de prensa.
4. Bonal F.J. *Farmacología Clínica*. 1vol. 1ra ed. Madrid: Editorial Síntesis S.A.; 1999.
5. Velásquez, P.L. *Farmacología básica y Clínica*. 18ª ed. Madrid España: Editorial Médica panamericana S.A.; 2005.
6. Graibeard, F. Chía Perú; 2015. [revisado el 25/01/15]. Disponible desde internet en: <<http://chiaperu.com/about/>>
7. Cahill, J. Etnobotany of Chia (*Salvia hispanica L.*). Revisado el 09/05/15. Disponible en internet: <[http://es.wikipedia.org/wiki/salvia\\_hispanica#caracter](http://es.wikipedia.org/wiki/salvia_hispanica#caracter)>c3.
8. Berckemeyer F. Los alimentos que consumían los mejores guerreros de la antigüedad. el comercio 07 de mayo 2013. [revisado el 05/03/15]. Disponible desde internet en: <[http://elcomercio.pe/gastronomia/nutricion/alimentos-que-consumian-mejores-guerreros-antiguedad-como-incluirlos-tu-dieta-noticia-1573481?ref=flujo\\_tags\\_183072&ft=nota\\_1&e=titulo](http://elcomercio.pe/gastronomia/nutricion/alimentos-que-consumian-mejores-guerreros-antiguedad-como-incluirlos-tu-dieta-noticia-1573481?ref=flujo_tags_183072&ft=nota_1&e=titulo)>
9. Chateauneuf R. La chía (*Salvia hispanica L.*) un gran alimento y de cualidades medicinales extraordinarias; 2011. Revisado el 03/02/2015. Disponible en internet en: <http://www.rochade.cl/?p=1687>.
10. Jiménez P. - Masson L. - Quitral V. *Composición Química de Semillas de Chía, Linaza y Rosa Mosqueta y su Aporte en ácidos grasos omega-3* Rev. chil. nutr. vol.40 no.2 Santiago; 2013. [con Acceso el 10/01/15]. Disponible desde internet:

<[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071775182013000200010](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182013000200010)>

11. Ixtaina Y. V. Caracterización de la semilla y aceite de chía obtenido por distintos procesos aplicación en tecnología de alimentos. Universidad nacional de la plata. Facultad de ciencias exactas. Buenos Aires Argentina; 2010.
12. Fernández I., Ayerza R., Coates W. Características nutricionales de la chía. Universidad de Buenos Aires –Argentina; 2006. Revisado 15/02/15. Disponible en internet en: <[repository.lasallista.edu.co/.../La\\_chia\\_salvia\\_hispanica\\_L\\_desarrollo\\_alimentos\\_salu](http://repository.lasallista.edu.co/.../La_chia_salvia_hispanica_L_desarrollo_alimentos_salu)>
13. Ibañez V. L. Evaluación de la Toxicidad Aguda y la Acción Hipolipemiente del Aceite de *Plukenetia Volubilis*, Sacha Inchi. Universidad de san Martín de Porres- lima 2006. Revisado el 30/01/15. Disponible en internet: <[http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2006\\_I/Art7\\_Vol6\\_N1.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2006_I/Art7_Vol6_N1.pdf).>
14. Devlin M. T. Bioquímica Libro de texto con Aplicaciones Clínicas. Barcelona España. 5ª edición. Editorial Reverte S.A. 2004.
15. Stryler L. T. J. *Bioquímica sexta edición*. Barcelona-España. Editorial Reverte S.A.; 2008
16. Thomas, D.M. *Bioquímica Cuarta Edición*. Barcelona España. Editorial Reverte S.A.; 2004
17. Marcelo, A. O. *Semiología Médica, Fisiopatología, Semiotecnia y Terapéutica*. México: Editorial Medica Panamericana S.A. DE.C.V. ; 2005
18. Ayersa, R. C. Whine. *La Chía Redescubriendo un Olvidado Alimento de los Aztecas*. Buenos Aires Argentina. Editorial Del nuevo extremo; 2006.
19. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. SR-21, Nutrient Data *Nutrition facts and Analysis for seeds, Flaxseed*; USDA: 2010. Revisado el 14/05/15. Disponible en internet: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>.>
20. Lomarche A., Torres M. *Fundamentos Teóricos Prácticos De química Orgánica*, Argentina, Encuentro Editorial; 2008.
21. Núñez CE. Extracción sólido líquido, Soxhlet, 2008. Revisado el 14/03/15. Disponible en internet:

<<http://procesosbio.wikispaces.com/Extracci%C3%B3n+s%C3%B3lido-l%C3%ADquido>>

22. Velasco J. R., Villada S. H., Carrera E. J. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. Universidad del Cauca, Departamento de Agroindustria, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Información Tecnológica Vol 18(1), 53-65. Colombia, 2007. Disponible en internet: <[www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071807642007000100009](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071807642007000100009)>
23. Gutiérrez M.C., Droguet M. Identificación de compuestos volátiles por CG-MS. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Boletín Intexter (U.P.C.) n°122, 2002.
24. Estremera R.; Ruiz C.; Nieves C. "Espectrometría de Masas" Universidad de Puerto Rico en Aguadilla de Química. Laboratorio de Química Orgánica Revisado el 25/08/2016. Disponible en internet: <<http://docplayer.es/7846507-5-31-2013-universidad-de-puerto-rico-en-aguadilla-area-de-quimica-laboratorio-de-quimica-organica.html>>
25. Melloni Eisner Dox. *Diccionario Médico Ilustrado*. Editorial Reverté S.A. Barcelona España 1983.
26. Mehlenbacher, V. C. *Análisis de Grasas y Aceites*. Ediciones Urmo. Tomo 6. España; 1970
27. Ugarte, G. M., Pilco A. E. Obtención de aceite a partir de las semillas de (Sacha Inchi), trabajo de investigación, Cusco - Perú; 2009.
28. Serrano C.A. Indicaciones de los Hipolipemiantes. Revista del sistema nacional de salud. Vol. 4 N°2 España; 2010. Disponible en internet: [https://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos\\_propios/infmedic/docs/vol34n2indHipolipemiantes.pdf](https://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/infmedic/docs/vol34n2indHipolipemiantes.pdf)
29. Holguino H. A. A., Tello V. R. M. Evaluación de Efecto Hipoglicemiante e Hipolipemiante Decocción de las Vainas de *Pisum sativum L.* (arveja) en ratas. Universidad de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010.
30. Archile A.; Benitez B.; Rangel L.; Izquierdo P. Perfil de Ácidos Grasos y Aceites disponibles para el consumo. Revista científica, FCV vol. 7 N° 3.

- Venezuela, 1997. Disponible en internet:  
<<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27041/2/articulo3.pdf>>
31. Frank D. Pat S. Philip W. Mejorar el análisis de metil ésteres de ácidos grasos de retención de tiempo métodos y bases de datos de tiempo de retención. Agilent Technologies. USA; 2002.
  32. Osorio G. R. Propiedades Físicas y Químicas. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Colombia; 2015. Disponible en internet:  
<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/ocw/mod/page/view.php?id=226>
  33. Paucar M. Luz. Guía de prácticas de tecnología de aceites y grasas universidad nacional de la santa facultad de ingeniería agroindustrial Chimbote Perú; 2013.
  34. Villar F.A. M. Farmacognosia General. Madrid España Editorial Síntesis S.A.; 1999.
  35. Norma técnica Peruana. 209.005. Aceites y grasas comestibles. Método para la determinación de la acidez libre. Lima – Perú 1ª edición, revisada el 2011.
  36. Norma técnica Peruana. 209.006. Aceites y grasas comestibles. Método de determinación del índice de peróxidos. Lima – Perú. 1ª edición, revisada el 2011.
  37. Norma técnica Peruana. 209.008. Aceites y grasas comestibles. Método de determinación de del índice de yodo. Método de Wijs. Lima – Perú 1ª edición, revisada el 2012.
  38. Norma técnica Peruana. 209.058. Aceites y grasas comestibles. Método de determinación del índice de saponificación. Lima – Perú. 1ª edición, revisada el 2011.
  39. Fuentes P.F., Mendosa Y.R. Rosales F. A. Cisneros T. R. *Guía de Manejo de Animales de Laboratorio* del Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú 2008.
  40. Salgado A., Márquez G. y Dobarganes M.C. “Influencia de la cantidad, calidad y tipo de grasa de la dieta sobre la composición y distribución de ácidos grasos del tejido adiposo de ratas”, Instituto de la Grasa y sus Derivados. Sevilla- España 1992.



41. González E.G, Sanchez G., Cioccia A.M., Hevia, Absorción de grasa proveniente de tres fuentes dietarias en ratas con diarrea inducida con lactosa Universidad Simón Bolívar, Caracas-Venezuela, 2001.
42. Cuentas R. Yanet. *Guía de prácticas de laboratorio de Farmacodinamia II*. Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica. UNSAAC, 2011.
43. Tomaylla C. Ciro. *Guía de prácticas de laboratorio de Bioquímica I*. Escuela profesional de Química. UNSAAC, 2016.
44. Alvarado H.B; Dávila M. R.; Ramos R.E.; García A. L. "Manual de bioquímica II". Benémerita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas. México, 2008. Revisado el 10/07/16. Disponible en internet: [químicosfarmacobiologos.bligoo.com.mx](http://químicosfarmacobiologos.bligoo.com.mx)
45. Bartosik R., Leandro C., Enzo D. "Comparación de determinación de humedad de semillas de especies forrajeras por método de estufa y a través de instrumento de medición electrónico por capacitancia". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Buenos Aires Argentina 2013. Revisado el 01/06/16. Disponible desde internet en: [intainforma.inta.gov.ar/?tag=proyecto-de-eficiencia-de-poscosecha-precop](http://intainforma.inta.gov.ar/?tag=proyecto-de-eficiencia-de-poscosecha-precop)
46. Gomez C. M. influencia del agua en la calidad del aceite. Universidad politécnica de Madrid España; 2013. Revisado el 14/07/16. Disponible en internet: [oa.upm.es/21876](http://oa.upm.es/21876)
47. Salguero A., Susana H. Pettinicchi, S., Comparación del contenido de aceite en semilla de *Jatropha curcas L.* Por extracción con fluido supercrítico y soxhlet. Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero Santiago del Estero, Argentina. 2007. Revisado el 01/06/16. Disponible desde internet en: [www.scielo.cl/pdf/infotec/v18n1/art09.pdf](http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v18n1/art09.pdf)
48. Sánchez s. Guillermo. Caracterización y cuantificación de los ácidos grasos omega 3 y omega 6 presentes en el aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis L.*). Universidad nacional de Colombia facultad de ciencias - escuela de química. Colombia; 2012. Revisado el 05/08/2016. Disponible en internet: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9141/1/3496371.2012.pdf>
49. CODEX, Norma para Grasas y Aceites Comestibles, no regulados por normas individuales. CODEX Stan 19-1981 (Rev. 2-1999). Revisado el

15/07/2016. Disponible en internet:

<http://www.fao.org/download/standards>.

50. Salazar E., Belén D. Jiménez N. Características fisicoquímicas del aceite de la semilla de la Coroba. Universidad de Oriente. Departamento de Ingeniería Química. Centro de Investigaciones en Biotecnología Industrial y Alimentos. Puerto la Cruz, Estado Anzoátegui-Venezuela-2004
51. Pantoja A. Lisset; Maldonado M. Caracterización del contenido de aceite de dos oleaginosas: sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*) Y canola (*brassica napus y brassica rapa*). Universidad san francisco de quito ecuador, 2012.
52. Arilmi G.; Arroyo J.; Quispe F.; Cisneros B. y colaboradores. "Toxicidad oral a 60 días del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*) y linaza (*Linum usitatissimum L.*) y determinación de la dosis letal 50 en roedores". Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública V.27 N.3. Lima- Perú, 2010. Revisado el 05/08/2016. Disponible en internet: <[www.scielosp.org/pdf/rpmesp](http://www.scielosp.org/pdf/rpmesp)>
53. Nasiff h. Alfredo. Ácidos grasos trans, omega 3 y omega 6. Hospital clínico quirúrgico San Lázaro. La Habana- cuba; 2009.
54. Rodríguez C. M.; Tovar R. A.; Prado M.; Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos polinsaturados y sus beneficios en la salud. Unidad en investigación Médica en Nutrición. Departamento de la fisiología de la nutrición. México, 2005.
55. García Luna P. P. y López Gallardo G. Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal Unidad de Nutrición Clínica. UGEN. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Hospital Ciudad Real. Sevilla- España 2007
56. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Las grasas y aceites en la nutrición. FAO; 1997. Revisado el 15/07/2016. Disponible en internet:  
<https://books.google.com.pe/books?isbn=9253036214>
57. Muñoz E.J.; Saldivar S. E.; Maldonado T. C.; Muñoz M. J. "La habilidad para sujetar y manejar animales de laboratorio no se adquiere fácilmente". Universidad Autónoma de Zacatecas. México. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria Vol. 12, N° 5B Mayo/2011. Revisado el 15/08/2016. Disponible en internet:  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511B/051116.pdf>

58. Tentens, I. "Opinion on the safety of Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds as a food ingredient." European Food Safety Authority, 2009.
59. Solchem Nature. "Chia (*Salvia hispanica* L.). Barcelona, 2016. Disponible en internet: <<http://solchem.es/news-emailmkt/GENERAL/CHIA/DP-chia.pdf>>
60. Scacchi B. P. A. "Síndrome metabólico y melatonina: Estudio de dos modelos experimentales en ratas". Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Médicas. Argentina, 2012. Disponible en internet: <<https://books.google.com.pe/books?id=3c8LCAAQBAJ>>
61. Gallegos J.; Vizcaya M.; Rodríguez E. "La semilla y su composición" Universidad Nacional Experimental Politécnica de la Fuerza Armada Bolivariana. Venezuela, 2011. Disponible en internet: <http://www.monografias.com/trabajos87/semilla-y-su-composicion/semilla-y-su-composicion2.shtml#ixzz4WEd5QLOQ>

# ANEXOS

## **ANEXO 1: MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATAS Y RATONES**

Para el cuidado de los animales de experimentación ratas y ratones, se les debe proporcionar un microambiente que constituye la caja o jaula y la altura de las paredes de la caja no debe ser menor de 12.7cm, debe tener pisos y paredes fáciles de limpiar y con tapas removibles de rejillas o perforadas debe ser cerrado, seguro y protegido de amenazas externas y una superficie mínima de 80 cm<sup>2</sup> por animal y debe ser de fácil accesibilidad para los alimentos y agua para el animal.<sup>(39)</sup> En el macro ambiente se debe ver el aire y la ventilación que deben ser constantes, la temperatura debe ser de 20-25°C y la humedad relativa ambiental entre 40-70 %, la intensidad de luz y tipo de iluminación debe contar con luz artificial provista de lámparas fluorescentes tipo luz día con iluminación a un metro de piso. Se recomienda 12 horas de luz/ 12hrs de oscuridad<sup>(39)</sup>.

Ya que son muy sensibles al ruido es necesario evitar cualquier tipo de ruido, se permitirá un nivel máximo de ruido de 85 decibeles si estos son mayores tienen efecto nocivo de estrés y reproducción<sup>(39)</sup>. El olor: no se debe utilizar desinfectantes que emanen olores que sean irritantes y mucho menos desodorizantes<sup>(39)</sup>.

Los animales deben recibir alimento en cantidad y calidad suficiente para sus necesidades y para conservar la salud, el alimento se suministra diariamente; se incrementará los días que se considere necesario por razones de fuerza mayor. El agua debe ser renovada en forma total, diariamente o cada dos días, eliminando todo contenido residual del frasco de bebida<sup>(39)</sup>.

La rata es un animal dócil y menos nervioso el macho que la hembra, para extraerlo de la jaula, se debe abrir previamente la rejilla, dejar que los animales tomen confianza y posteriormente se realiza una sujeción de todo el cuerpo, con los 5 dedos, en forma gentil, una de las técnicas más recomendadas para su sujeción consiste en apoyar la nuca del animal en el borde interno del dedo índice, si se sujeta con la mano derecha, el dedo pulgar pondrá el miembro anterior izquierdo del animal frente a su hocico, el miembro anterior izquierdo quedará sujeto entre el dedo índice y medial, de manera que la cabeza quede inmóvil y en caso de los ratones, para su manejo hay que considerar que es un animal muy sensitivo, nervioso y rápido. Para sacarlo de su jaula hay que

introducir la mano y tomarlo de la cola o colocar los dedos por debajo de su cuerpo para que suba a la palma de la mano. Posteriormente para sujetarlo, se pone al animal en una superficie rugosa para permitir que se estire con sus patas superiores, se levanta de la cola y se toma la mayor cantidad de piel de la nuca con los dedos índice y pulgar, sosteniendo la cola con el dedo meñique, apoyado en la palma de la mano, sujeto de esta manera se le puede aplicar cualquier tipo de administración y no causarle daño alguno <sup>(57)</sup>.

Cabe resaltar que los investigadores que trabajen y experimenten con animales están moralmente obligados a manifestarles tres tipos de actitudes: respeto, afecto y gratitud. Así mismo, se puede decir que la investigación biomédica en animales es éticamente aceptable, si se sigue el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar <sup>(39)</sup>.

- › Reducir, al máximo el número de ellos y, por ende, el total de animales utilizados en investigación.
- › Reemplazar, siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo experimental, cuando no resulte imprescindible el uso de animales.
- › Refinar, los métodos y técnicas utilizados de modo que produzcan al animal el menor sufrimiento posible.

El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva <sup>(40)</sup>.

**ANEXO 2: CONDICIONES DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTOMETRÍA DE MASAS.**

*CUADRO 10: CONDICIONES PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTOMETRÍA DE MASAS.*

<b>Cromatógrafo:</b>	Agilent 6890N	
<b>Detector de Masas Agilent:</b>	5975B	
<b>Energía de Ionización:</b>	70Ev	
<b>Modo de Ionización:</b>	Impacto Electrónico (IE)	
<b>Modo de escaneo de masas:</b>	40-500	
<b>Inyector Automático:</b>	7683B	
<b>Columna:</b>	DB-23, 60m x I.D 0.250 x 0.15um Film.	
<b>Condiciones del cromatógrafo</b>		
<b>Temperatura del Horno inicial 140°C</b>		
<b>Rampa:</b>		
<b>Pasos °C/min</b>	<b>temp °C</b>	<b>Final time</b>
Inic. 0	140	
1 0	140	5.00
2 5.00	230	12.00
<b>Tiempo de Corrida:</b>	35.00 min	
<b>Puerto de Inyección</b>		
<b>Modo:</b>	Split	
<b>Relación de Split:</b>	10:1	
<b>Temp. Inicial:</b>	250 °C	
<b>Tipo de Gas:</b>	Helio	
<b>Flujo:</b>	0.8 mL/min	
<b>Volumen de Inyección:</b>	0.1uL	

Fuente: Laboratorio de química CG/EM

### ANEXO 3: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL ACEITE DE *Salvia hispánica L.* (CHÍA)

CUADRO 11: RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL ACEITE DE *Salvia hispánica L.* (Chía)

Muestra	Criterios				
	Recuento de mesofilos viables	Hongos y levaduras	Coliformes fecales( <i>escherichia coli</i> )	Salmonella	Stafilococcus aureus
Aceite de las semillas de salvia hispánica l. chía	ausente	Ausente	Ausente	Ausente	ausente
Límites permisibles	5x10 <sup>5</sup> -5x10 <sup>6</sup> UFC	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> UFC	Ausente o en rango 10-10 <sup>2</sup> UFC	0 UFC	10-102 UFC

**Fuente:** Elaboración Propia

UFC= unidades formadoras de colonias

#### Análisis e Interpretación:

El control microbiológico realizado en el aceite de *Salvia hispánica L.* (chía) como se muestra en la cuadro N° 11 no se encontró mesofilos viables, hongos y levaduras, coliformes fecales, *salmonella* y *estafilococcus aureus*, lo que indica que el aceite fue apto para la realización de los estudios farmacológicos y toxicológico, así eliminar los posibles riesgos de contaminación y alteración de resultados. Cumpliendo los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos, establecidos y recomendados por resolución ministerial n°:615-2003-SA/DM aprobado por la DIGESA (Dirección General de Salud).



## ANEXO 4: CONSTANCIA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. CHIA

### UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL  
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO  
Calle Tigre N° 127  
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA  
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210  
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL  
Plaza de Armas s/n  
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- MUSEO INKA  
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA  
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"  
Av. De la Cultura N° 721  
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

#### FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

#### LABORATORIO DE NUTRICIÓN

#### CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, analista responsable del Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, dejo constancia.

Que las bachilleres, Lisbeth Huarhua Ynquiltupa, Elizabeth Puma Apaza de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado al laboratorio una (1) muestra de semillas de chía, para hacer el análisis de lípidos y la extracción del mismo en cuatro (4) repeticiones, como parte de su proyecto de investigación titulado : "Evaluación de las características fisicoquímicas, toxicidad aguda y determinación del efecto hipolipemiante del aceite de las semillas de *salvia hispánica* L. (chía) cultivadas en el distrito de Mollepata – Anta – Cusco". Para tal fin se ha utilizado el Extractor de Fluidos Super críticos MV10- Waters.

Cusco, 23 de Mayo del 2016



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA  
Oficina de Promoción de Labios y Prestación de Servicios - K'ayra  
*Juan E. Múscoco Muñoz*  
Ing. M. Sc. Juan E. Múscoco Muñoz  
Unidad *K'AYRA*

Responsable (e) del Laboratorio

# ANEXO 5: CONSTANCIA DEL ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad  
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

## CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, analista responsable del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que las Bachilleres, **Lisbeth Huarhua Ynquiltupa, Elizabeth Puma Apaza** de la Escuela Profesional Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado al laboratorio 1 muestras de aceite de las semillas de chia, para su caracterización e identificación de Ácidos grasos presentes, como parte de su proyecto de investigación titulado: "Evaluación de las características fisicoquímicas, toxicidad aguda y determinación del efecto hipolipemiente del aceite de las semillas de *salvia hispánica L.* (chia) cultivadas en el distrito de Mollepata - Anta - Cusco". Para tal fin se ha utilizado el Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N, acoplado a un Espectrómetro de Masas Agilent 6890N para la caracterización de ácidos grasos, la identificación se basó en la comparación de las señales del espectro de masas de la muestra de aceite de chia con 17 estándares de ácidos grasos y los datos compilados en la librería FAME DB23 y NIST v011 Wiley.

Se expide la siguiente constancia a solicitud de las interesadas para los fines que viera por conveniente.


Cusco, 23 de Mayo del 2016

Arre



Quim. Jorge Choquenaira Parí  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
Espectrometría – UNSAAC.  
CGP - 914

**ANEXO 6: CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (RATA ALBINA)**

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO			
CERTIFICADO SANITARIO N°		290-2015	
Producto	: Rata Albina	Lote N°	: R - 12 - 2015
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 40
Cepa	: Holtzman	Edad	: 1 mes ½
Peso	: 100 a 130 gr.	Sexo	: hembras
G.R.	: 032125	Destino	: Univ. Nac. San Antonio de Abad Cuzco
Lima	: 09-12-2015		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, <b>Arturo Rosales Fernández</b>. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p>			
Chorrillos, 09 de Diciembre del 2015 (Fecha de emisión del certificado)			
<b>NOTA</b> : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.		 ..... M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586	

## ANEXO 7: CERTIFICADO DE SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (RATON ALBINO)

<b>INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO</b>			
<b>CERTIFICADO SANITARIO N°</b>		<b>024-2016</b>	
Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M-05-2016
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 28
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 1 mês ½
Peso	: Mayor a 25 gr.	Sexo	: hembras
G.R.	: 032277	Destino	: Puma Apaza, Elizabeth
	:		: Cuzco
Chorrillos	: 02 de Febrero del 2016		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, <b>Arturo Rosales Fernández</b>. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias * .</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p> <p>Chorrillos, 02 de Febrero del 2016 (Fecha de emisión del certificado)</p> <p><b>NOTA:</b> El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>			
		 ..... M.V. Arturo Rosales Fernández. C.M.V.P. 1586	

## ANEXO 8: MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL TOTAL EN SUERO O PLASMA



# Colestat

enzimático

Método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma

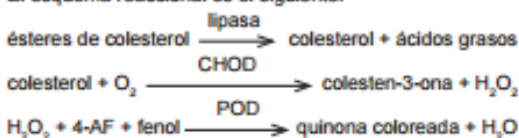
### SIGNIFICACION CLINICA

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

- A. Reactivo A: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l.
- B. Reactivo B: solución de fenol 55 mmol/l.
- C. Reactivo C: suspensión conteniendo lipasa fungal 300 U/ml, colesterol oxidasa (CHOD) 3 U/ml y peroxidasa (POD) 20 U/ml.
- S. Standard: solución de colesterol 2 g/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 1ª amb.)

### REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

### INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: mezclar por inversión antes de usar.

Reactivo A: listo para usar.

Reactivo B: listo para usar. Ver PRECAUCIONES.

Reactivo C: homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo de Trabajo: según el volumen de trabajo colocar en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de Reactivo A, 5 partes de Reactivo B y llevar a 100 partes con agua destilada. Agregar 2 partes de Reactivo C previamente homogeneizadas.

Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar.

Pueden prepararse distintas cantidades respetando las proporciones 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 B no deteriore el Reactivo de Trabajo.

### PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo B (fenol) es tóxico e irritante. R36/38: irrita los ojos y la piel. R25: tóxico por ingestión. S24/25: evitese el contacto con los ojos y la piel. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

### 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 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**

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

**CONVERSION DE UNIDADES**

- colesterol (g/l) = colesterol (mg/dl) x 0,01
- colesterol (mmol/l) = colesterol (g/l) x 2,59
- colesterol (g/l) = colesterol (mmol/l) x 0,39

**METODO DE CONTROL DE CALIDAD**

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (Standatrol S-E 2 niveles) con concentraciones conocidas de colesterol, con cada determinación.

**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**

- 250 ml (Cód. 1220101)
- 1000 ml (Cód. 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.J. - 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, 4ª ed., 2001.


#### SIMBOLOS


Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"


 Representante autorizado en la Comunidad Europea


 Uso diagnóstico "in vitro"


 Contenido suficiente para <n> ensayos


 Fecha de caducidad

 Limite de temperatura (conservar a)


 No congelar

 Riesgo biológico


 Volumen después de la reconstitución

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante


 Consultar instrucciones de uso


 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cótola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
Disp. Nº: 5983/83-5660/99



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina

## ANEXO 9: MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN EN SUERO DEL LDL-COLESTEROL



# LDL Colesterol

## Reactivo Precipitante

Para la separación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero

### SIGNIFICACION CLINICA

El contenido aproximado de colesterol en cada familia de lipoproteínas es (en % por unidad de peso): 1% en los quilomicrones, 18% en las VLDL, 50% en las LDL y 23% en las HDL. Dado que cada familia posee distinta actividad biológica, el significado clínico de un aumento de colesterol depende de la o las lipoproteínas que se encuentran en exceso.

Por otra parte, los mecanismos reguladores de los niveles plasmáticos de lipoproteínas son muy complejos y pueden ser afectados por múltiples factores (genéticos, ambientales, fisiológicos o patológicos), siendo posible encontrar valores de colesterol total cercanos al rango normal acompañados de alteraciones en las fracciones lipoproteicas.

Las HDL y las LDL han sido las más estudiadas por su importante actividad biológica:

- las LDL, producto del metabolismo de las VLDL en plasma, son las encargadas del transporte del colesterol exógeno (y en mucho menos proporción, endógeno) hacia el interior de las células;
- las HDL, sintetizadas en el hígado, remueven el colesterol no utilizado por las células (dentro de ciertos límites de concentración), transportándolo hacia el hígado para su degradación.

Diversos estudios epidemiológicos han confirmado que el exceso de colesterol de LDL con respecto a un valor crítico (1,9 g/l) debe ser considerado como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria, considerando que el efecto protector de las HDL sólo parece tener relevancia dentro de cierto rango de concentraciones de colesterol circulante. Tales hallazgos permiten deducir que los valores aislados de colesterol de HDL o de LDL no pueden tomarse como índices predictivos de riesgo, sino que es necesario conformar un perfil lipídico con los valores de colesterol total, colesterol de HDL y colesterol de LDL.

### FUNDAMENTOS DEL METODO

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL o  $\beta$ -lipoproteínas) se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan las demás lipoproteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determina empleando el sistema enzimático Colesterol oxidasa/ Peroxidasa con colorimetría según Trinder (FenoV4-AF).

Por diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el colesterol unido a las LDL.

### REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A (Reactivo Precipitante): solución 1 g/l de

sulfato de polivinilo disuelto en polietilenglicol (PM: 600) al 25%, pH 6,7.

### REACTIVOS NO PROVISTOS

Colestat enzimático, Colestat enzimático AA o Colestat enzimático AA líquida, de Wiener lab.

### INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo A: listo para usar.

### PRECAUCIONES

El reactivo es para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

### ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivo A: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

### INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Todo cambio en la coloración u otro aspecto físico del reactivo, puede ser indicio de deterioro del mismo.

### MUESTRA

Suero

a) Recolección: el paciente debe estar en ayunas (de 12 a 16 horas). Obtener suero de la manera usual y separar del coágulo dentro de la hora de la extracción.

b) Aditivos: no se requieren.

c) Sustancias interferentes conocidas: los sueros hipertriglicéridémicos (con quilomicronemia) producen sobrenadantes turbios; la bilirrubina interfiere en niveles mayores de 50 mg/l.

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

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el suero debe ser preferentemente fresco. En caso de no procesarse en el momento, puede conservarse en el refrigerador (2-10°C) durante no más de 24 horas contadas a partir del momento de la extracción. No congelar.

### MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Centrifuga.
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.



- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de Kahn.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

#### PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn, colocar:

Muestra	200 ul
Reactivo A	100 ul

Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 15 minutos en un baño de agua a 20-25°C. Centrifugar 15 minutos a 3000 r.p.m. Separar inmediatamente el sobrenadante. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

Usar el sobrenadante como Muestra para el ensayo colorimétrico.

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	100 ul
Standard	-	20 ul	-
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C si se usa el Reactivo de Trabajo de Colestat enzimático AA/líquida o 15 minutos a 37°C si se usa el de Colestat enzimático. Retirar del baño y enfriar. Leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando el aparato a cero de absorbancia con el Blanco.

#### CALCULO DE LOS RESULTADOS

LDL colesterol (g/l) = Colesterol total (\*) - (D x f)

$$f = \frac{0,624}{S}$$

(\*) Valor obtenido con Colestat enzimático o Colestat enzimático AA/líquida.

El valor 0,624 surge de:

$$0,624 = 2 \text{ (g/l)} \times \frac{VF_e}{V_m} \times \frac{VR_e}{VR_s} \times \frac{V_s}{V_c}$$

donde:

$VF_e$  = volumen final del extracto = 0,3 ml

$V_m$  = volumen de muestra procesada = 0,2 ml (200 ul)

$VR_e$  = volumen de reacción con el extracto = 2,1 ml

$VR_s$  = volumen de reacción con el Standard = 2,02 ml

$V_s$  = volumen de Standard en la reacción = 0,02 ml (20 ul)

$V_c$  = volumen de extracto en la reacción = 0,1 ml (100 ul)

Si se emplean volúmenes diferentes el factor 0,624 varía y debe ser calculado nuevamente.

#### VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de LDL colesterol en relación al riesgo de contraer enfermedad cardíaca coronaria (ECC):

- **Riesgo bajo o nulo** (sujetos normales): valores de LDL colesterol menores de 1,29 g/l.
- **Riesgo moderado a elevado** (individuos con probabilidad de contraer ECC): valores entre 1,30 y 1,89 g/l.
- **Riesgo muy elevado** (individuos sospechosos de padecer ECC): valores de LDL colesterol  $\geq$  1,90 g/l.

No obstante, es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Cuando se procesen muestras ictericas, deberán diluirse los sueros 1/2 ó 1/3 con solución fisiológica y emplearse el procedimiento habitual, teniendo en cuenta el factor de dilución para los cálculos.

Cuando el LDL colesterol no puede separarse por completo en una centrifuga común debido a niveles elevados de triglicéridos, puede efectuarse la determinación de la siguiente manera:

Seguir las instrucciones indicadas en PROCEDIMIENTO hasta la incubación en baño de agua a 20-25°C, 15 minutos, luego colocar la mezcla de reacción en capilares y centrifugar en centrifugas de microhematocrito, a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos. Cortar el capilar desechando el precipitado y utilizar el sobrenadante límpido para la prueba.

En todos los casos en que los valores de colesterol unido a HDL y VLDL (D x f, según los cálculos) sean superiores a 1 g/l, se debe repetir la determinación con los mismos sueros empleando 100 ul de muestra y 200 ul de Reactivo A. Continuar con la técnica descrita, tomando 100 ul de sobrenadante y utilizando el factor 1,248 para los cálculos en lugar del anterior.

No dejar el precipitado en contacto con el sobrenadante, debido a que puede haber redisolución provocando valores de lecturas elevados con la consiguiente disminución de los valores de LDL colesterol.

#### PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando replicados de una misma muestra en el día, se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
1,14 g/l	$\pm$ 0,03 g/l	2,6 %
2,03 g/l	$\pm$ 0,04 g/l	2,0 %

b) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 5 g/l.

c) **Límite de detección:** en espectrofotómetro, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O., el cambio mínimo de concentración detectable será de 0,0063 g/l de colesterol.

#### PRESENTACION

Para procesar 100 muestras (Cód. 1220104).


#### BIBLIOGRAFIA

- Seidel, D. - Ann. Clin. Biochem. 19:278 (1982).

- Levy, R.I. - Clin. Chem. 27/5:653 (1981).
- 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, 4<sup>th</sup> ed., 2001.


## SIMBOLOS


Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"


 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"


 Contenido suficiente para <n> ensayos


 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico


 Volumen después de la reconstitución

 Contenido


 Número de lote


 Elaborado por:

 No bio

 Corrosivo / Caústico

 Irritante


 Consultar instrucciones de uso

 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.L.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Tec.: Viviana C. Ceola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
Disp. N°: 199-486-18700-710306



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina

870750000 / 01 p. 3/9

UR140906

# ANEXO 10: MÉTODO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAR EL HDL-COLESTEROL EN SUERO.



## HDL Colesterol

### Reactivo Precipitante

Para la separación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero o plasma

#### SIGNIFICACION CLINICA

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas. Estas partículas solubilizan y transportan el colesterol en el torrente sanguíneo.

La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas.

La función principal de las lipoproteínas de alta densidad o HDL (high density lipoprotein) en el metabolismo lipídico es la captación y transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado en un proceso conocido como transporte reverso de colesterol (mecanismo cardioprotectivo).

El HDL colesterol bajo, está asociado con un alto riesgo de enfermedad cardíaca. Por este motivo la determinación de HDL colesterol es una herramienta útil en la identificación de individuos de alto riesgo.

#### FUNDAMENTOS DEL METODO

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se separan precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) mediante el agregado de sulfato de dextrán de PM 50.000 en presencia de iones  $Mg^{++}$ .

En el sobrenadante separado por centrifugación, quedan las HDL y se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el sistema enzimático Colesterol oxidasa/Peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/Ami-nofenazona).

#### REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de sulfato de dextrán (PM 50.000) 0,032 mmol/l.

B. Reactivo B: solución de cloruro de magnesio 1,5 M.

#### REACTIVOS NO PROVISTOS

Colestat enzimático, Colestat enzimático AA o Colestat enzimático AA líquida de Wiener lab.

#### INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo Precipitante (A+B): preparación: en el frasco provisto, medir 2,5 ml de Reactivo A y 2,5 ml de Reactivo B. Mezclar por inversión y colocar fecha de preparación. Pueden prepararse cantidades menores de acuerdo a las necesidades, respetando la proporción 1 + 1 para ambos reactivos.

#### PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales

de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

#### ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Reactivo Precipitante: es estable 6 meses a temperatura ambiente o 1 año en refrigerador (2-10°C) a partir de la fecha de preparación.

#### INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cualquier indicio de contaminación bacteriana puede ser signo de deterioro de los reactivos.

#### MUESTRA

Suero o plasma

a) **Recolección:** obtener la muestra de la manera habitual.

b) **Aditivos:** en caso de utilizar plasma, recogerlo únicamente con heparina.

c) **Sustancias interferentes conocidas:** anticoagulantes distintos de la heparina y bilirrubinemia mayor de 50 mg/l son causas de interferencia.

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

d) **Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** separar el suero dentro de la hora de la extracción. Las Lipid Research Clinics recomiendan refrigerar la muestra hasta la realización del ensayo. El almacenamiento o conservación de las muestras a temperatura ambiente altera la composición lipoproteica de las muestras aún antes de las 24 horas. Algunos autores mencionan estabilidad de 3 días a 4°C que se prolongan al congelar, pero existe mucha variabilidad entre muestras diferentes, por lo que se recomienda mantener la muestra refrigerada y procesar dentro de las 24 horas.

#### MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas.
- Tubos de Kahn.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.
- Baño de agua a 37°C.
- 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: 45 minutos
- Volumen de muestra: 500 ul
- Volumen de Reactivo Precipitante: 50 ul
- Volumen de Sobrenadante: 100 ul
- Volumen de Reactivo de Trabajo de Colestat enzimático o Colestat enzimático AA/liquida: 2 ml
- Volumen final de reacción: 2,1 ml

#### PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn medir 0,5 ml (500 ul) de muestra, y agregar 50 ul de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 30-40 minutos en refrigerador (2-10°C) o 15 minutos en baño de agua a la misma temperatura. No colocar en congelador. Centrifugar 15 minutos a 3000 r.p.m. Usar el sobrenadante límpido como muestra.

En 3 tubos marcados B, S y D colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	100 ul
Standard	-	20 ul	-
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C si se usa el Reactivo de Trabajo de Colestat enzimático AA/liquida o 15 minutos a 37°C cuando se usa el de Colestat enzimático. Retirar del baño y enfriar. Leer a 505 nm en espectrofotómetro o en colorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando a cero con el Blanco.

#### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción es estable 2 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

#### CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{HDL Colesterol (g/l)} = D \times f \quad f = \frac{0,457}{S}$$

$$0,457 = 2 \text{ (g/l)} \times \frac{VF_E}{V_M} \times \frac{VR_E}{VR_S} \times \frac{V_S}{V_C} \quad \text{donde:}$$

$VF_E$  = volumen final de extracto = 0,55 ml

$V_M$  = volumen de muestra procesada = 0,5 ml

$VR_E$  = volumen de reacción con extracto = 2,1 ml

$VR_S$  = volumen de reacción con Standard = 2,02 ml

$V_S$  = volumen de Standard en la reacción = 0,020 ml

$V_C$  = volumen de extracto en la reacción = 0,1 ml

Si se emplean volúmenes de Reactivo diferentes de 2 ml el factor 0,457 varía y debe ser calculado nuevamente, reemplazando en la fórmula  $VR_E$  y  $VR_S$ .

#### VALORES DE REFERENCIA

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

0,40 - 0,60 g/l

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. No obstante, valores mayores de 0,40 g/l se consideran recomendables y los que se encuentren por encima de 0,60 g/l se han considerado como protectivos. Por el contrario, valores de HDL colesterol por debajo de 0,40 g/l se consideran como índice significativo de riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA

La exactitud y precisión de la determinación dependen fundamentalmente de la observación de las condiciones de precipitación, por lo que los tiempos y temperaturas establecidos, si bien no requieren un control riguroso, deben ser respetados.

Cuando el HDL colesterol no puede separarse por completo en una centrifuga común debido a niveles elevados de triglicéridos puede efectuarse la determinación de la siguiente manera: seguir las instrucciones indicadas en PROCEDIMIENTO hasta la incubación a 4-10°C y luego de la misma, colocar la mezcla de reacción en tubos capilares y centrifugar en centrifugas de microhematocrito a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos. Cortar el capilar desechando el precipitado y utilizar el sobrenadante límpido para la prueba.

#### PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de una misma muestra en el día se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
0,29 g/l	± 0,011 g/l	3,8 %
0,63 g/l	± 0,023 g/l	3,7 %

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 5 g/l.

c) Límite de detección: en espectrofotómetro, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O., el cambio mínimo de concentración detectable será de 0,0063 g/l de colesterol.

#### PRESENTACION






















Equipo para procesar 100 muestras (Cód. 1220103).

#### BIBLIOGRAFIA

- Castelli, W. P.; Levitas I. M. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Cooper, C. et al. - National Heart and Lung Institute, (USA) (1974).
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Kostner, G.M.et al. - Clin. Chem. 25/6:939 (1979).
- Stanbury, J. B.; Wyngaarden, J. B.; Fredrickson, D. S. - "The Metabolic Basis of Inherited Disease", Mc Graw - Hill Book Co., 2ª ed., 1966.
- 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", AACCC Press, 4ª ed., 2001.

# Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Nocivo
	Uso diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Caústico
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Irritante
	Fecha de caducidad		Consultar instrucciones de uso
	Límite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	No congelar		Control
	Riesgo biológico		Control Positivo
	Volumen después de la reconstitución		Control Negativo
	Contenido		Número de catálogo
	Número de lote		

Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
 Robamba 2344  
 2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
 Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
 Bioquímica  
 Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
 Disp. N°: 5984/83-319/00



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina

# ANEXO 11: MÉTODO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAR LOS TRIGLICÉRIDOS EN SUERO.



## 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

A. Reactivo A: viales conteniendo lipoprotein lipasa, glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF).  
 B. Reactivo B: solución de buffer Good conteniendo clorofenol, pH 7,5.  
 S. Standard: solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivalente 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 de 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 Reactivo B a un vial de Reactivo A. Mezclar hasta disolución completa. Homoge-

neizar y fechar.

- 4 x 50 ml: reconstituir el contenido de un vial de Reactivo A con una porción de Reactivo B y luego transferir al frasco de Reactivo B enjuagando varias veces. Homogeneizar y fechar.

### PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

### 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 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.
- 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 o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Muestra	-	-	10 ul
Standard	-	10 ul	-
Reactivo de Trabajo	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.

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

#### CONVERSION DE UNIDADES

Triglicéridos (g/l) = 0,01 x Triglicéridos (mg/dl)

Triglicéridos (mg/dl) x 0,0113 = Triglicéridos (mmol/l)

#### METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (Stan-datrol S-E 2 niveles) con concentraciones conocidas de triglicéridos, con cada determinación.

#### 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

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, 4ª ed., 2001.

# Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Nocivo
	Uso diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Caústico
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Irritante
	Fecha de caducidad		Consultar instrucciones de uso
	Límite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	No congelar		Control
	Riesgo biológico		Control Positivo
	Volumen después de la reconstitución		Control Negativo
	Contenido		Número de catálogo
	Número de lote		

Wiener Laboratorios S.A.L.C.  
 Riobamba 2944  
 2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
 Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
 Bioquímica  
 Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
 Cert. N°: 2085/07



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina

870920022 / 00 p. 3/9

UR120007



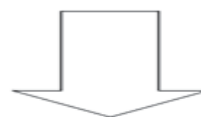
## ANEXO 12: ANEXO FOTOGRÁFICO

### SELECCIÓN, SECADO Y LIMPIEZA DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (chía)



Foto N°1

*FOTOGRAFÍA N° 1: Semillas de Salvia hispánica L. (Chía).*



*FOTOGRAFÍA N° 2: Selección y pesado de las semillas de Salvia hispánica L. (Chía).*



Foto N°2



Foto N° 3

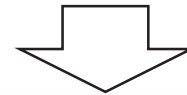
*FOTOGRAFÍA N° 3: Secado de las semillas de Salvia hispánica L. (Chía)*

## PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE *Salvia hispánica* L. (CHÍA) EN EQUIPO DE SOXHLET.

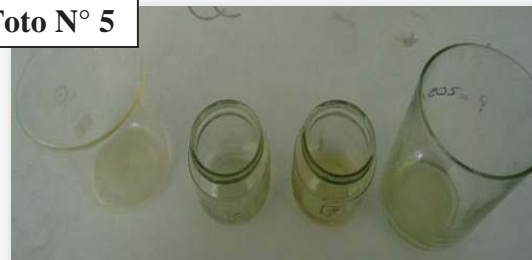


**FOTOGRAFÍA N° 4:** Equipo de Soxhlet en el proceso de extracción del aceite de las semillas de *Salvia hispánica* L. (Chía).

**FOTOGRAFÍA N° 5:** Aceite obtenido por el equipo de Soxhlet.



**Foto N° 5**



## EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (CHÍA) EN EQUIPO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.



**Foto N°6**

**FOTOGRAFÍA N° 6:** Extracción del aceite de las semillas de *Salvia hispánica* L. (Chía) en equipo de fluidos súper críticos.

**FOTOGRAFÍA N° 7:** Aceite obtenido de la extracción en fluidos supercríticos.

**Foto N°7**



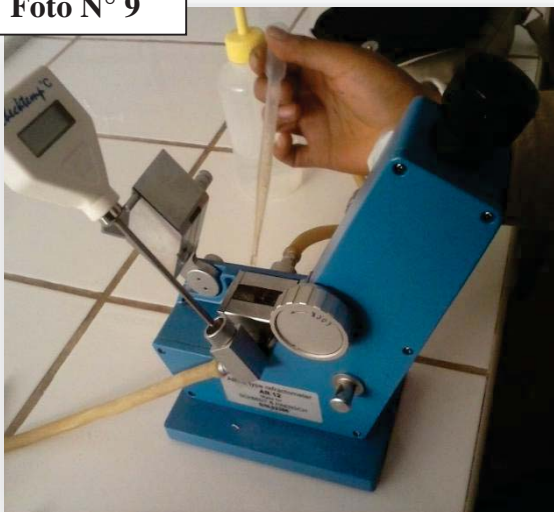
**DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL  
ACEITE *Salvia hispánica L. (Chía)*.**

**FOTOGRAFÍA N° 8:** *Determinación de la densidad del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L. (Chía)*.*



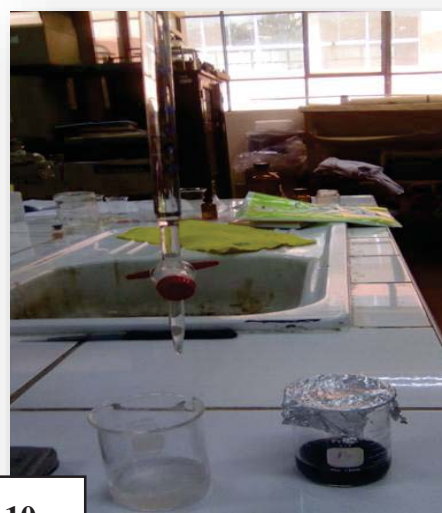
**Foto N° 8**

**Foto N° 9**



**FOTOGRAFÍA N° 9:** *Determinación del índice de refracción del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L. (Chía)*.*

**FOTOGRAFÍA N° 10:** *Titulación de la muestra para determinar el índice de yodo.*



**Foto N° 10**

**FOTOGRAFÍA N° 11:** *Proceso de titulación para la determinación del índice de acidez.*



**Foto N° 11**

**Foto N° 12**



**Foto N° 13**

**FOTOGRAFÍA N° 12:** *Titulación de la muestra para determinar el índice de peróxidos.*

**FOTOGRAFÍA N° 13:** *Cambio de color de la muestra después de la titulación para determinación del índice de peróxidos.*

**FOTOGRAFÍA N°14:** Preparación de la muestra para determinación del índice de saponificación.



Foto N°14

### DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L.* (CHÍA).

**FOTOGRAFÍA N° 15:** Grupo de ratones usados para la determinación de la toxicidad aguda del aceite de las semillas de *Salvia hispánica L.* (Chía).

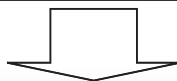


Foto N°15

## DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (Chía).



Foto N° 16

**FOTOGRAFÍA N° 16:** Distribución de los animales de experimentación en grupo de a 6.

**FOTOGRAFÍA N° 17:** Administración de aceite de *Salvia hispánica* L. (Chía).



Foto N° 17

**FOTOGRAFÍA N° 18:** Extracción de las muestras de sangre de los animales de experimentación.

**FOTOGRAFÍA N° 19:** Muestra de sangre para determinar el perfil lipídico.



Foto N° 18



Foto N° 19



Foto N° 20



Foto N° 21



**FOTOGRAFÍA N° 20 Y FOTOGRAFÍA N°21:** Muestras para dar lectura del colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos en el espectrofotómetro.

**FOTOGRAFÍA N° 22:** Lectura en el espectrofotómetro.  
**FOTOGRAFÍA N° 23:** Se muestra los resultados de la lectura realizada en el espectrofotómetro

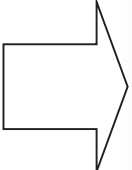


Foto N° 22

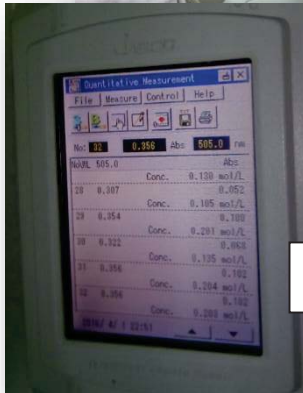
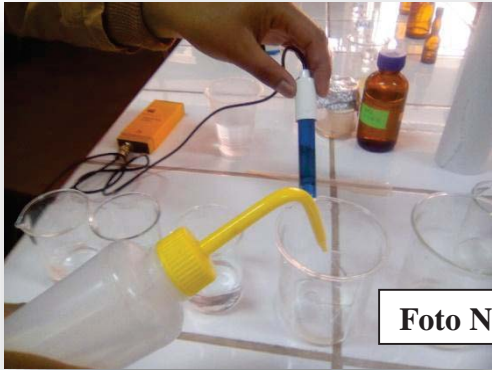


Foto N° 23

**INFLUENCIA DEL pH GASTROINTESTINAL, EN LA EMULSIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS de *Salvia hispánica L. (Chía)*.**



**Foto N° 24**

**FOTOGRAFÍA N°24:** Preparación de los diferentes valores de pH.

**FOTOGRAFÍA N° 25:** Incubación de los diferentes valores de pH más el aceite de las semillas de *Salvia hispánica L. (Chía)*.



**Foto N° 26**

**FOTOGRAFÍA N°26:** Observación de la influencia del pH sobre el aceite de chía más la bilis.



**Foto N° 25**



## DETERMINACIÓN DE LA ABSORCIÓN APARENTE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica* L. (Chía).



Foto N°27

*FOTOGRAFÍA N°27: Grupo de ratas para la determinación de la grasa absorbida aparente.*

*FOTOGRAFÍA N°28: Heces recolectadas para determinar la grasa eliminada.*



Foto N°28



Foto N°29



Foto N°30

*FOTOGRAFÍA N°29: Extracción de aceite de las heces, en el equipo de Soxhlet.*

*FOTOGRAFÍA N° 30: Aceite extraído de las heces de ratas.*

## DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL ACEITE DE CHÍA EN EL ESTÓMAGO E INTESTINO DELGADO.



Foto N°31

*FOTOGRAFÍA N° 31: Diseción del animal de experimentación para extraer el estómago e intestinos.*

*FOTOGRAFÍA N° 32: Medición del intestino delgado para obtención de muestras.*



Foto N°32



Foto N° 33

*FOTOGRAFÍA N°33: Extracción de muestra del estómago.*

*FOTOGRAFÍA N° 34: Muestras listas para observar al microscopio.*



Foto N°34

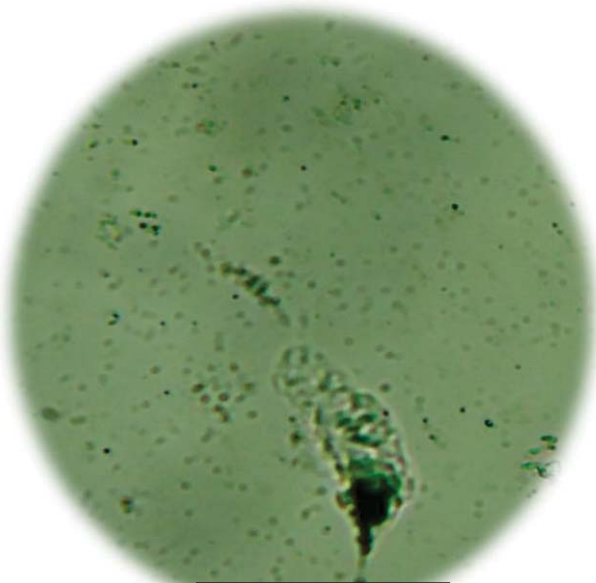


**Foto N° 35**

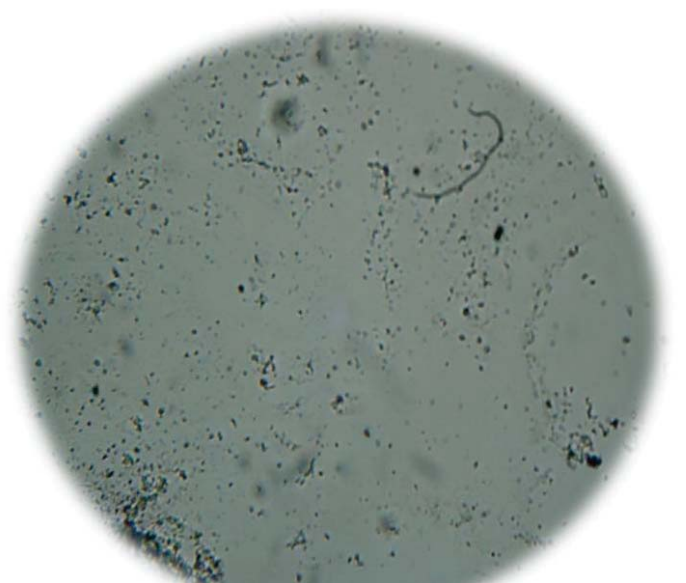
***FOTOGRAFÍA N° 35:** Observación al microscopio.*

***FOTOGRAFÍA N° 36:** Observación al microscopio en 10X del estómago a las dos horas del grupo blanco.*

***FOTOGRAFÍA N° 37:** Observación al microscopio en 10X del intestino a las dos horas del grupo blanco.*



**Foto N° 36**



**Foto N° 37**

**FOTOGRAFÍA N° 38:** Observación al microscopio en 40X del estómago a las dos horas del grupo de ratas con aceite de chía.

**FOTOGRAFÍA N° 39:** Observación al microscopio en 40X del intestino a las dos horas del grupo de ratas con aceite de chía.

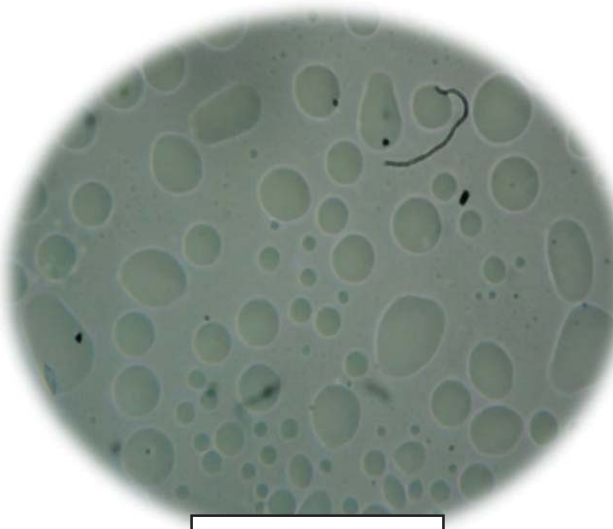


Foto N° 38

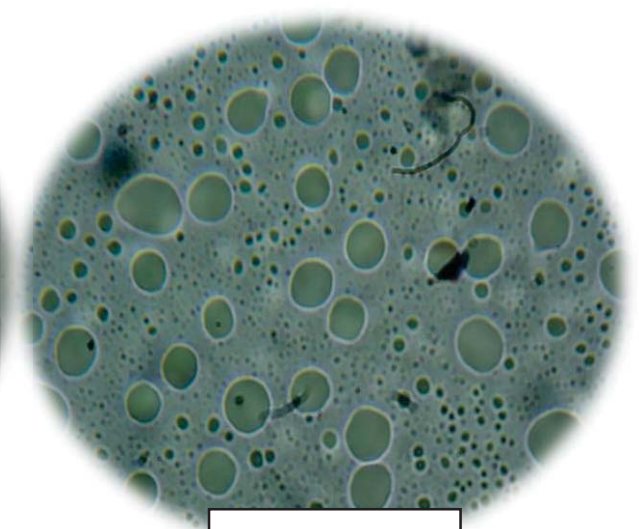


Foto N° 39

**FOTOGRAFÍA N° 40:** Observación al microscopio en 40X del estómago a las 4 horas del grupo de ratas con aceite de chía.

**FOTOGRAFÍA N° 41:** Observación al microscopio en 40X del intestino a las 4 horas del grupo de ratas con aceite de chía.

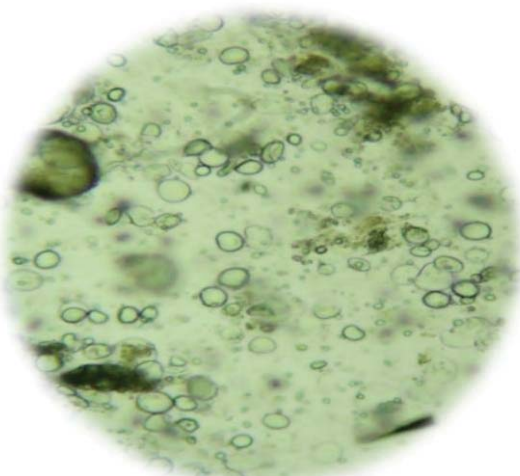


Foto N° 40



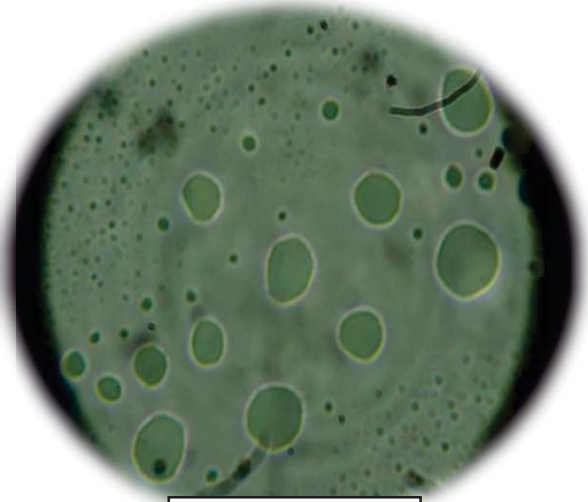
Foto N° 41

**FOTOGRAFÍA N° 42:** Observación al microscopio en 40X del estómago a las 8 horas del grupo de ratas con aceite de chía.

**FOTOGRAFÍA N° 43:** Observación al microscopio en 40X del intestino a las 8 horas del grupo de ratas con aceite de chía.



**Foto N° 42**



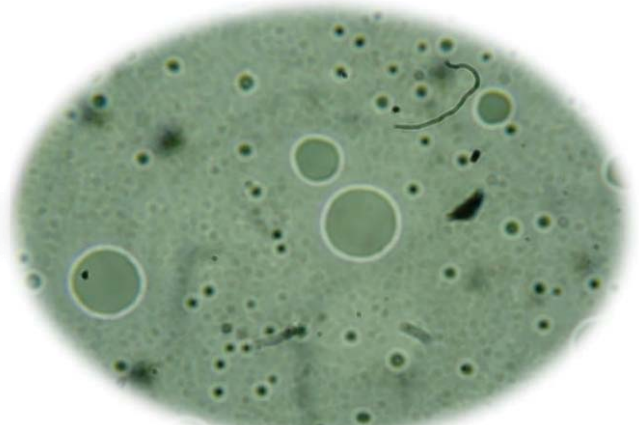
**Foto N° 43**

**FOTOGRAFÍA N° 44:** Observación al microscopio en 10X del intestino a las 12 horas del grupo de ratas con aceite de chía.

**FOTOGRAFÍA N° 45:** Observación al microscopio en 40X del intestino a las 12 horas del grupo de ratas con aceite de chía.



**Foto N° 44**



**Foto N° 45**

**FOTOGRAFÍA N° 46:** Observación al microscopio en 10X del estómago a las 24 horas del grupo de ratas con aceite de chía.

**FOTOGRAFÍA N° 47:** Observación al microscopio en 40X del intestino a las 24 horas del grupo de ratas con aceite de chía.

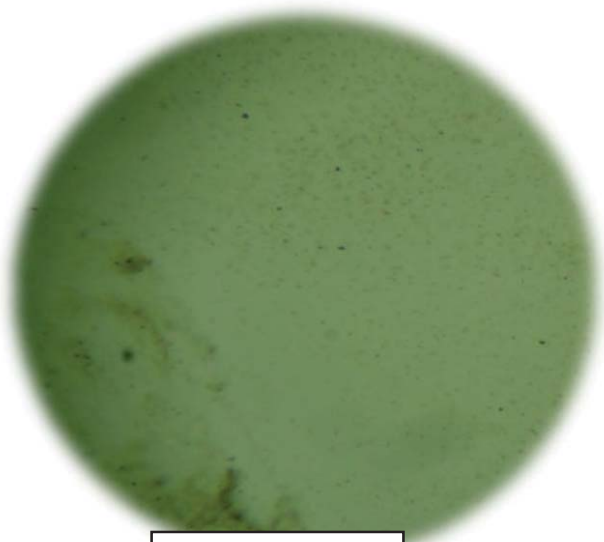


Foto N° 46

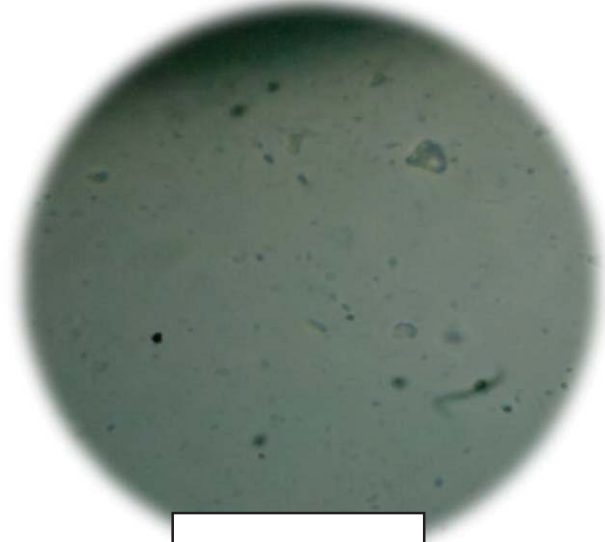


Foto N° 47

## DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA BILIS EN LA HIDRÓLISIS DE LÍPIDOS

**FOTOGRAFÍA N°48:** Tubos con muestra de aceite de chía y bilis de vacuno.

**FOTOGRAFÍA N°49:** Titulación de las muestra con aceite de chía, bilis y pancreatina al 1%.

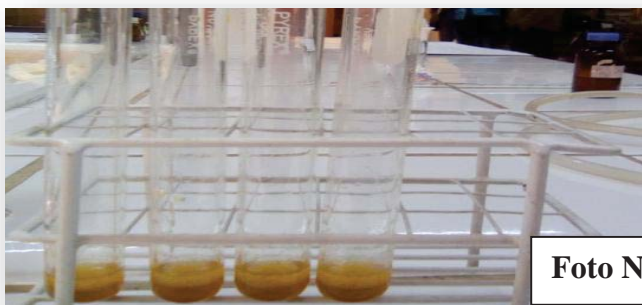
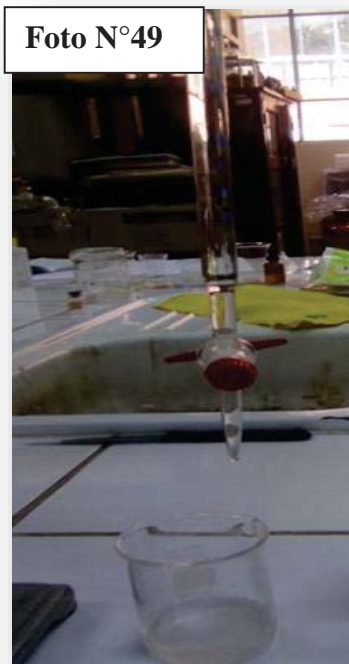


Foto N°48

Foto N°49





**Foto N° 50**

**FOTOGRAFÍA N° 50:** Titulación de las muestras de aceite de chía con la bilis y la pancreatina.

**FOTOGRAFÍA N°51:** Resultados de la titulación en la hidrolisis de los lípidos.



**Foto N°51**

**ANEXO 13: FORMATO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS EN LA DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL TOTAL, HDL-COLESTEROL, LDL-COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS.**

<b>DETERMINACION DEL COLESTEROL TOTAL, LDL, HDL Y TRIGLICERIDOS</b>						
	ROTONES	ABSORVANCIA	RESULTADOS BASALES	ABSORBANCIA	RESULTADOS DESPUES DEL TRATAMIENTO	OBSERVACIONES
<b>GRUPO 1</b>	BLANCO 1					
	BLANCO 2					
	BLANCO 3					
	BLANCO 4					
	BLANCO 5					
<b>GRUPO 2</b>	CONTROL 1					
	CONTROL 2					
	CONTROL 3					
	CONTROL 4					
	CONTROL 5					
<b>GRUPO 3</b>	R1					
	R2					
	R3					
	R4					
	R5					
	R6					
<b>GRUPO 4</b>	R7					
	R8					
	R9					
	R10					
	R11					
	R12					
<b>GRUPO 5</b>	R13					
	R14					
	R15					
	R16					
	R17					
	R18					





**ANEXO 15: FORMATO USADO PARA EL APUNTE DE LAS CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE**

<b>DETERMINACIÓN FISCOQUÍMICA DEL ACEITE DE <i>Salvia hispánica L.</i> (Chía)</b>		
	<b>RESULTADOS</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
<b>DENSIDAD</b>		
<b>ÍNDICE DE REFRACCIÓN</b>		
<b>ÍNDICE DE YODO</b>		
<b>ÍNDICE DE ACIDEZ</b>		
<b>ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN</b>		
<b>ÍNDICE DE PERÓXIDOS</b>		

**Salvia hispánica L. (Chía)**

**ANEXO 16: FORMATO USADO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS EN LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispánica L.* (Chía)**

<b>Equipo</b>	<b>PESO DEL VIAL VACÍO (G)</b>	<b>PESO DE MUESTRA MOLIDA (G)</b>	<b>PESO DE VIAL MÁS ACEITE (G)</b>	<b>PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)</b>	<b>PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO (%)</b>
<b>Muestra 1</b>					
<b>Muestra 2</b>					
<b>Muestra 3</b>					

**ANEXO 17: FORMATO USADO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA EN RATONES.**

<b>Grupos</b>	<b>N° de animales</b>	<b>Días</b>	<b>Dosis (ml/kg)</b>	<b>N° de muertes</b>	<b>N° de vivos</b>	<b>Observaciones</b>
N°						
N°						
N°						
N°						
N°						
N°						
N°						

**ANEXO 18: FORMATO USADO PARA EL CONTROL DE PESOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.**

<b>Dosis ml/kg</b>	<b>Peso/días</b>			
	<b>Inicial</b>	<b>Tercer día</b>	<b>Séptimo día</b>	<b>Observaciones</b>