



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Instituto de Bioingeniería

TESIS DOCTORAL

Parámetros de calidad en nutraceuticos y fuentes naturales de omega-3, valorados aplicando un protocolo normalizado de trabajo en Oficina de Farmacia

Trabajo presentado por:

Vanessa M. García Hernández

Directores de la Tesis:

Dra. Elena García García
Dr. Enrique Roche Collado
Elche, 2017



Universidad Miguel Hernández

Instituto de Bioingeniería

A quien corresponda:

Eugenio Vilanova Gisbert, Catedrático de Toxicología y Director del Instituto de Bioingeniería.

HACE CONSTAR

Que da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral presentada por Dña. **Vanessa M. GarcíaHernández**, titulada “Parámetros de calidad en nutracéuticos y fuentes naturales de omega-3, valorados aplicando un protocolo normalizado de trabajo en Oficina de Farmacia”.

Lo que firmo en Elche, a instancias del interesado y a los efectos oportunos

Eugenio Vilanova Gisbert

Catedrático de Toxicología

Director del Instituto de Bioingeniería



Dña. **Elena García García**, profesora titular y D. **Enrique Roche Collado**, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral: “Parámetros de calidad en nutracéuticos y fuentes naturales de omega-3, valorados aplicando un protocolo normalizado de trabajo en Oficina de Farmacia”, que presenta Dña. **Vanessa M. García Hernández** para optar al **Grado de Doctora** por la Universidad Miguel Hernández, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología Aplicada e Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Elche ade 2017.

Fdo. **Elena García García**

Fdo. **Enrique Roche Collado**

VºBº Director del Instituto de Bioingeniería

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias de todo corazón a las dos personas más importantes de mi vida, mis padres, ya que gracias a su apoyo incondicional, valoración, paciencia e incondicional creencia en mi valía y aptitudes, han hecho posible que haya llegado hasta aquí. Por ello y por tantas otras cosas, siempre os estaré eternamente agradecida.

En segundo lugar, quiero dar encarecidamente las gracias a la Dra. Elena García, (Directora de esta tesis), que fue quien me abrió las puertas del Instituto de Bioingeniería, me brindó la opción de involucrarme en una etapa de postgrado, plantearme un nuevo objetivo y guiarme hasta el final del camino que hoy concluye. Tuve la gran suerte de conocerla durante mi etapa de estudiante en la Universidad y fue su profesionalidad, sencillez y dulzura innata las que me cautivaron. Además, de ser una excelente persona, leal y fiel amiga.

Muchísimas gracias por tu dedicación y tiempo durante todos estos años.

Por otro lado, tengo que agradecer al Dr. y Catedrático Enrique Roche Collado, (Codirector de esta tesis), quien me abrió las puertas de su laboratorio y me ofreció un puesto de trabajo dentro del mismo, donde a su vez, ha tenido lugar gran parte del desarrollo de esta tesis.

Tanto a ti, Elena García, como a ti, Enrique Roche, siempre os estaré muy agradecida por la oportunidad que ambos me habéis ofrecido.

Agradezco a los catedráticos Ángel Carbonell Barrachina y Joaquín Sánchez Soriano por brindarme todo su apoyo y conocimiento científico.

Por otro lado, tengo que agradecer a la Licenciada M^a Asunción Iborra Campos por abrirnos las puertas de las instalaciones de su Oficina de Farmacia, donde se llevaron a cabo los estudios de intervención nutricional y a sus colaboradoras, Asun, Laura y Cristina, por prestarnos su ayuda de manera desinteresada durante el desarrollo de ambos estudios. Quiero agradecer también a Pepa Garri, por colaborar en la adquisición de las muestras de semilla de lino utilizadas en el estudio de intervención nutricional.

Para finalizar quiero agradecer, especialmente, a mi hermana Ana, mi sobrina Cynthia, Rafa, JD, Andrea, a los compañeros de laboratorio y a todos aquellos, que de un modo u

otro, han contribuido con su ayuda al desarrollo de esta tesis. A Encarna y a Néstor por su incondicional ayuda siempre que la he necesitado y muy cariñosamente a mis compañeros de trabajo, Ana y José Miguel, por haber estado ahí, por su lealtad y fiel amistad, por su apoyo y comprensión en momentos difíciles, por aportar ideas y ser parte intrínseca del trabajo de esta tesis.

A todos os estaré siempre infinitamente agradecida.



*“El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance, es decir,
la idea de que todo es posible”.*

Ray Bradley



A mis padres

Resumen

Actualmente, las dislipemias son un importante problema de salud en las sociedades modernas. Dada su prevalencia, la alta morbimortalidad, la repercusión en la calidad de vida de las usuarias y el gasto sanitario asociado, se hace necesario investigar estrategias para su prevención y tratamiento. En este contexto, la evidencia acumulada indica que el consumo de ácidos grasos omega-3, supervisado por un nutricionista, puede reducir los niveles de colesterol circulante. Dichos ácidos grasos están presentes en los pescados y frutos secos, así como en cápsulas que pueden adquirirse en Oficinas de Farmacia.

El primer aspecto relevante estudiado en el presente trabajo de tesis fue la calidad de los aceites de pescado encapsulados, midiendo su grado de oxidación. Se observó que el grado de oxidación era variable en las diferentes marcas comerciales analizadas. Como alternativa a los aceites de pescado, se encuentran los aceites de semillas como el lino, que por su riqueza en antioxidantes, no suelen presentar dichos problemas de oxidación. El desafío de estas fuentes de omega-3 reside en su dificultad en la extracción de la semilla. En este contexto, se estudiaron diferentes técnicas de extracción y la calidad final de los aceites obtenidos. Los mejores rendimientos fueron utilizando el método soxhlet y éter de petróleo como disolvente.

Como continuación del trabajo de tesis, se plantearon dos intervenciones nutricionales en una Oficina de Farmacia situada en Elche. Por primera vez, se estableció un protocolo de actuación que permitió conocer in situ los perfiles lipídicos de las usuarias, así como sus medidas antropométricas y otros parámetros. Posteriormente, las usuarias con niveles altos de colesterol que desearon participar, siguieron las dos intervenciones nutricionales consumiendo cápsulas de aceite de pescado en un caso, y semillas de lino en otro. Además, las participantes consumieron una dieta rica en pescado (hipolipémica) durante un mes. Los resultados indicaron que los ácidos grasos oxidados de aceites de pescado carecen de efecto hipocolesterolemiante. Por el contrario, los ácidos grasos no oxidados de aceite de pescado y de semilla de lino, junto con la dieta, son una buena estrategia nutricional para bajar el colesterol y triglicéridos en sangre. Además, el trabajo desde la Oficina de Farmacia ha permitido aplicar con éxito estrategias preventivas y correctivas para hiperlipemias, contribuyendo posiblemente a reducir la incidencia y la mortalidad por enfermedad cardiovascular.

Summary

Nowadays, dislipemias are an important health problem in modern societies. Taking into account the prevalence, the high morbimortality, the impact in the quality of life and the sanitary economical costs associated, it becomes necessary to investigate strategies for prevention and treatment. In this context, the accumulated evidence indicates that the intake of omega-3 fatty acids, under a nutritionist supervision, can reduce circulating cholesterol levels. These fatty acids are present in fish, nuts, as well as in capsules that can be purchased in pharmacies.

The first relevant aspect studied in the present thesis work was the quality of the fish oils encapsulated by determining the oxidation level. The oxidation degree was variable between the different commercial brands analyzed so far. As an alternative, seed oils such as flaxseed, rich in antioxidants, do not use to present oxidation problems. The challenge of these sources of omega-3 becomes from the difficulty of extraction from seeds. In this context, different extraction techniques were studied as well as the quality of the final oil products obtained. The best yield corresponded to oils extracted using soxhlet method and petroleum ether as solvent.

Following this thesis work, two nutritional interventions were planned in a Pharmacy establishment located in Elche. A protocol to know directly the circulating lipid profile of women costumers, as well as their anthropometric parameters, was set up for the first time. Afterwards, those women with high circulating cholesterol levels that wished to participate were selected for the two interventions consuming fish oil capsules in one case, and flaxseed in the other. In addition, participants followed a rich fish diet (hypolipemic) for one month. The obtained results indicated that oxidized fatty acids from fish oils were not capable to reduce blood cholesterol levels. On the other hand, non-oxidized fatty acids from fish oil and flaxseed together with diet were the best strategy to reduce circulating cholesterol and triglyceride levels. Moreover, this work in a Pharmacy establishment allowed to apply successful strategies for prevention and correction of hyperlipemias, contributing likely to reduce incidence and mortality due to cardiovascular disease.

Contenidos

1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. DISLIPEMIAS	27
1.2. CALIDAD DE LOS ACEITES DE PESCADO EN CÁPSULAS: OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS	28
1.3. FORMACIÓN DE EICOSANOIDES Y DOCOSANOIDES	33
1.4. INTERÉS NUTRICIONAL Y TERAPÉUTICO DE CÁPSULAS CONTENIENDO ACEITE OMEGA-3/OMEGA-6	36
1.5. INTERÉS NUTRICIONAL Y TERAPÉUTICO DE LA SEMILLA DE LINO	43
1.6. INGESTAS RECOMENDADAS Y VALORES DE REFERENCIA PARA ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	44
1.7. INGESTAS ACTUALES DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3	47
1.8. FUENTES ALIMENTARIAS DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES A TRAVÉS DE LA DIETA	51
1.8.1. PESCADO	51
1.8.2. OTRAS FUENTES ALIMENTARIAS	53
1.8.2.1. CEREALES Y DERIVADOS	53
1.8.2.2. FRUTAS, VERDURAS Y HORTALIZAS	53
1.8.2.3. LEGUMBRES Y FRUTOS SECOS	53
1.8.2.4. HUEVOS	53
1.8.2.5. CARNES Y DERIVADOS	54
1.8.2.6. ALIMENTOS ENRIQUECIDOS	54
1.9. COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS: LEGISLACIÓN	54

1.10. ¿QUÉ ES LA ATENCIÓN FARMACÉUTICA?	56
1.10.1. DESTINATARIOS	57
1.10.2. PAPEL DEL FARMACÉUTICO	58
1.10.3. UN NUEVO RETO: PUESTA EN MARCHA DESDE LA OFICINA DE FARMACIA	60
1.11. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA LLEVAR A CABO PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL EN EL AMBITO DE LA OFICINA DE FARMACIA	62
1.11.1. INICIACIÓN	62
1.11.2. DOCUMENTACIÓN	63
1.11.3. ACTUACIÓN	67
1.11.4. FINALIZACIÓN	68
1.11.5. RESULTADOS	80
1.11.6. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	80
1.11.7. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLA DE LINO ENTERA	80
1.11.8. DISCUSIÓN	81
2. OBJETIVOS	85
2.1. OBJETIVO METODOLÓGICO	85
2.2. OBJETIVOS BROMATOLÓGICOS	86
2.3. OBJETIVOS NUTRICIONALES	86
3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD: OXIDACIÓN DEL ACEITE OMEGA-3 ADMINISTRADO EN FORMA DE CÁPSULAS	89

3.1. TOMA Y ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS	89
3.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS: ACEITE DE PESCADO OMEGA-3	89
3.3. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARs): ACEITE DE PESCADO OMEGA-3	94
3.4. DETERMINACIÓN DE LA MEDIDA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN ULTRAVIOLETA (K_{232} , K_{270} y K_{280}): ACEITE DE PESCADO OMEGA-3	101
3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN SEMILLA DE LINO	105
3.5.1. TOMA Y ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS	105
3.5.2. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO SOXHLET	106
3.5.3. METILACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE LA SEMILLA DE LINO	116
3.5.4. ULTRASONIDOS	121
3.5.5. RANCIMAT	125
3.5.6. DETERMINACIÓN DE COLOR	127
3.6. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN FARMACÉUTICA	129
3.6.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR QUE SE PUEDEN CONTROLAR DESDE LA OFICINA DE FARMACIA	129
3.7. SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS PARTICIPANTES	132
3.7.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO Y POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	132
3.8. DETERMINACIÓN DE INDICADORES BIOLÓGICOS	134
3.8.1. MATERIAL NECESARIO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR	136

3.8.2. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR	137
3.8.3. INDICADORES BIOLÓGICOS ANALIZADOS	139
3.8.3.1. COLESTEROL TOTAL	139
3.8.3.2. COLESTEROL HDL	140
3.8.3.3. TRIGLICÉRIDOS	141
3.8.3.4. GLUCOSA	142
3.8.3.5. GPT	144
3.9. INDICES ANTROPOMÉTRICOS Y PRESIÓN ARTERIAL ANALIZADOS	146
3.9.1. IMC (ÍNDICE DE MASA CORPORAL)	146
3.9.2. RELACIÓN CINTURA-CADERA (CC)	148
3.9.3. PA: PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA, DIASTÓLICA Y PULSO	150
3.9.4. CARACTERÍSTICAS DE LA DIETA RICA EN PESCADO ADMINISTRADA A LAS PARTICIPANTES	152
3.10. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON CÁPSULAS OMEGA-3	153
3.10.1. RESUMEN	153
3.10.2. OBJETIVOS	153
3.10.3. MÉTODO	153
3.10.3.1. TIPO DE ESTUDIO: INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON CÁPSULAS OMEGA-3	153
3.10.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO	153

3.10.5. JUSTIFICACIÓN DE LA ELECCIÓN DE LOS CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	154
3.10.6. CÁPSULAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO	157
3.10.7. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	158
3.10.8. DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO	158
3.10.9. DIAGRAMA DE FLUJO	160
3.10.9.1. INTERVENCIÓN	160
3.10.9.2. PROCEDIMIENTO DE REGISTRO DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS	161
3.10.9.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS	162
3.11. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLA DE LINO	163
3.11.1. RESUMEN	163
3.11.2. OBJETIVOS	163
3.11.3. MÉTODO	164
3.11.3.1. TIPO DE ESTUDIO: INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLAS DE LINO	164
3.11.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO	164
3.11.5. SEMILLA DE LINO UTILIZADA EN EL ESTUDIO	165
3.11.6. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	167
3.11.7. DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO	167
3.11.8. DIAGRAMA DE FLUJO	169

	VI
3.11.9. INTERVENCIÓN	170
3.11.9.1. PROCEDIMIENTO DE REGISTRO DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS	170
3.11.9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS	171
4. RESULTADOS	175
4.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD: OXIDACIÓN DE ACEITES DE PESCADO RICOS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 ADMINISTRADOS EN FORMA DE CÁPSULAS	175
4.1.1. VALORES DE EPA Y DHA DE LAS DISTINTAS MARCAS ANALIZADAS	177
4.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS Y DEL NIVEL DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARs) EN ACEITES DE PESCADO RICOS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	177
4.3. DETERMINACIÓN DE LA MEDIDA ESPECTOFOTOMÉTRICA DE LA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN UV K_{232} , K_{270} y K_{280} EN ACEITES DE PESCADO RICOS EN ÁCIDOS OMEGA-3	179
4.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN SEMILLA DE LINO	181
4.4.1. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO SOXHLET	182
4.4.2. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO ULTRASONIDOS	184
4.4.3. METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE LA SEMILLA DE LINO	188
4.4.4. RANCIMAT	192
4.4.5. COLOR	193
4.5. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL UTILIZANDO CÁPSULAS CONTENIENDO ACEITE DE PESCADO RICO EN OMEGA-3	193

	VII
4.6. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLAS DE LINO	201
5. DISCUSIÓN	207
5.1. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN ACEITES DE PESCADO CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	211
5.2. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO EN ACEITE DE PESCADO CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	213
5.3. DETERMINACIÓN DE LA MEDIDA ESPECTOFOTOMÉTRICA DE LA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN UV (K_{232} , K_{270} y K_{280}) EN ACEITES DE PESCADO CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	216
5.4. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO SOXHLET Y ULTRASONIDOS	218
5.5. METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE LA SEMILLA DE LINO	220
5.6. RANCIMAT	224
5.7. COLOR	227
5.8. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON CÁPSULAS CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 PROVENIENTES DE ACEITES DE PESCADO	230
5.9. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLAS DE LINO	233
6. CONCLUSIONES	239
7. BIBLIOGRAFÍA	245
8. ANEXOS	277
8.1. MODELO ACUERDO FARMACÉUTICO-PACIENTE	277
8.2. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	279
8.3. ENCUESTA NUTRICIONAL	280

8.4. TEST DE CUMPLIMIENTO TERAPÉUTICO Y CONOCIMIENTO DE LOS FÁRMACOS	304
8.5. HOJA DE MEDICACIÓN DEL PACIENTE	306
8.6. HOJA DE PUNCIÓN CAPILAR PRE-POST INTERVENCIÓN CON CÁPSULAS OMEGA-3	307
8.7. HOJA DE PUNCIÓN CAPILAR PRE-POST INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLA DE LINO	308
8.8. DIETA	309
8.9. TARJETA DE SEGUIMIENTO	315
8.10. LISTADO DE PUBLICACIONES	316



Listado de Tablas

TABLA 1	
AGPI omega-6 importantes a nivel nutricional	39
TABLA 2	
AGPI omega-3 importantes a nivel nutricional	40
TABLA 3	
Acciones fisiológicas de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico (AA)	41
TABLA 4	
Acciones fisiológicas de los eicosanoides derivados del EPA y de los docosanoides derivados del DHA	42
TABLA 5	
Distribución de TG en la linaza	44
TABLA 6	
Ingestas recomendadas de DHA según la edad	47
TABLA 7	
Lista de comprobación CONSORT	70
TABLA 8	
Lista de comprobación STROBE: ESTUDIOS OBSERVACIONALES	74
TABLA 9	
Peso de la muestra según el índice de peróxidos	92
TABLA 10	
Presentación de las distintas muestras de semilla de lino	106
TABLA 11	
Solventes utilizados en las extracciones con soxhlet	110
TABLA 12	
Detalle de las condiciones cromatográficas	118
TABLA 13	
Principales ácidos grasos identificados	119

TABLA 14	
Grados de obesidad según el IMC en adultos	148
TABLA 15	
Riesgo de presentar comorbilidades en función de la circunferencia de la cintura	149
TABLA 16	
Características de la dieta diaria rica en pescado administrada a las participantes	152
TABLA 17	
Composición nutricional de las cápsulas utilizadas en el estudio	157
TABLA 18	
Características demográficas de las participantes	158
TABLA 19	
Distribución de las participantes en la intervención nutricional en función del tipo de cápsula consumida	159
TABLA 20	
Incidencias y adversidades acontecidas durante el período de intervención	162
TABLA 21	
Composición nutricional de la semilla de lino en el estudio	165
TABLA 22	
Características demográficas de las participantes	167
TABLA 23	
Distribución de las usuarias participantes en la intervención nutricional que han consumido semillas de lino	168
TABLA 24	
Incidencias y adversidades acontecidas durante el período de intervención	170
TABLA 25	
Antioxidantes declarados por cápsula en las distintas marcas comerciales	176
TABLA 26	
Valores de EPA + DHA por cápsula según indicación del fabricante para las marcas analizadas	177

TABLA 27	
Valores medios y desviaciones típicas de los índices de peróxidos (media \pm sem) y TBARs para las diferentes marcas analizadas. Análisis de varianza (Tukey HSD)	178
TABLA 28	
Subgrupos Ks en los que se han agrupado las distintas marcas comerciales de cápsulas de aceite de pescado	179
TABLA 29	
Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método soxhlet usando éter de petróleo	182
TABLA 30	
Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método soxhlet usando éter dietílico	183
TABLA 31	
Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método soxhlet usando n-hexano	183
TABLA 32	
Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método ultrasonidos utilizando éter de petróleo	184
TABLA 33	
Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método ultrasonidos utilizando éter dietílico	184
TABLA 34	
Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método ultrasonidos utilizando n-hexano	185
TABLA 35	
ANOVA (%) aceite extraído según el método de extracción	187
TABLA 36	
Análisis de varianza multifactorial para el modelo de tres factores	187
TABLA 37	
ANOVA (%) aceite extraído según las distintas marcas comerciales	188
TABLA 38	
Perfil de ácidos grasos en semillas de lino	190

TABLA 39	
Composición de ácidos grasos de aceite de lino	191
TABLA 40	
Estabilidad oxidativa de las distintas muestras de semilla de lino	192
TABLA 41	
Determinación de la coordenada de luminosidad (L*), de la coordenada roja-verde (a*) y de la coordenada amarillo-azul (b*) en las distintas muestras de semilla de lino	193
TABLA 42	
Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo	194
TABLA 43	
Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo	195
TABLA 44	
Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo	195
TABLA 45	
Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo	196
TABLA 46	
Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo	197
TABLA 47	
Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo	197
TABLA 48	
Características antropométricas y presión arterial de las participantes al inicio (día 1) y al final del estudio (día 30). Los resultados se expresan como media \pm sem	199
TABLA 49	
Cambios en los parámetros circulatorios de las participantes al inicio (día 1) y al final del estudio (día 30). Los resultados se expresan como media \pm sem	199

TABLA 50

Cambios en los parámetros circulatorios de las participantes al inicio (día 1) y al final (día 30). Los resultados se expresan como media \pm sem

202

TABLA 51

Cambios en los pesos y presión arterial de las participantes al inicio (día 1) y al final (día 30). Los resultados se expresan como media \pm sem

204



Listado de Figuras

FIGURA 1 <i>Rutas metabólicas para la transformación de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) en resolvinas y protectinas. Ciclooxygenasa (COX); lipooxigenasa (5-LOX)</i>	35
FIGURA 2 <i>Rutas metabólicas para la transformación de los ácidos linoleico y α-linolénico de la dieta en los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga</i>	37
FIGURA 3 <i>Bureta</i>	93
FIGURA 4 <i>Determinación IP</i>	93
FIGURA 5 <i>Espectrofotómetro DR600</i>	101
FIGURA 6 <i>Espectrofotómetro ultravioleta (DU[®] SERIE 520)</i>	105
FIGURA 7 <i>Equipo soxhlet</i>	111
FIGURA 8 <i>Rotavapor</i>	113
FIGURA 9 <i>Diagrama de flujo de la extracción de aceite de semilla de lino mediante soxhlet</i>	115
FIGURA 10 <i>Proceso de extracción del aceite (para su metilación) mediante rotavapor</i>	119
FIGURA 11 <i>Cromatógrafo de gases</i>	120
FIGURA 12 <i>Ultrasonidos</i>	123

FIGURA 13 <i>Diagrama de flujo de la extracción de aceite de semilla de lino mediante ultrasonidos</i>	124
FIGURA 14 <i>Rancimat</i>	126
FIGURA 15 <i>Colorímetro</i>	128
FIGURA 16 <i>Esquema del Protocolo Normalizado de Trabajo (PNT)</i>	131
FIGURA 17 <i>Farmacia IBORRA</i>	132
FIGURA 18 <i>Doctoranda Vanessa M. García Hernández y Lcda. M^a Asunción Iborra Campos</i>	132
FIGURA 19 <i>Zona de entrevista a las participantes</i>	134
FIGURA 20 <i>Rapid Control (Reflotrón® Plus)</i>	136
FIGURA 21 <i>Guantes, alcohol y algodón</i>	137
FIGURA 22 <i>Tiras reactivas</i>	137
FIGURA 23 <i>Lancetas, aplicador, capilares + soporte y tiras reactivas</i>	137
FIGURA 24 <i>Llenado del capilar con la muestra de sangre</i>	138
FIGURA 25 <i>Trasvase de la sangre del capilar a la tira reactiva</i>	138
FIGURA 26 <i>Registro de los datos obtenidos de cada uno de los parámetros bioquímicos</i>	138

FIGURA 27 <i>Báscula de precisión y tallímetro</i>	147
FIGURA 28 <i>Cinta métrica</i>	148
FIGURA 29 <i>Referencias anatómicas para determinar la circunferencia de la cintura</i>	149
FIGURA 30 <i>Tensiómetro</i>	151
FIGURA 31 <i>Esquema del diseño del estudio experimental</i>	159
FIGURA 32 <i>Diagrama de flujo de las participantes</i>	160
FIGURA 33 <i>Aporte de semilla de lino en yogur</i>	166
FIGURA 34 <i>Esquema del diseño del estudio experimental</i>	168
FIGURA 35 <i>Diagrama de flujo de las participantes</i>	169
FIGURA 36 (A, B, C) <i>Gráficos de caja y bigotes para los tres coeficientes de extinción molares (K_s) medidos en el total de muestras analizadas: K_{232} (A), K_{270} (B) y K_{280} (C)</i>	180-1
FIGURA 37 <i>Porcentaje del contenido de grasa afectado por el método de extracción (soxhlet o ultrasonidos) y el disolvente (éter de petróleo, éter dietílico y n-hexano)</i>	186
FIGURA 38 <i>Perfil cromatográfico</i>	190

Acrónimos y símbolos

a*	Coordenada colorimétrica rojo-verde
AA	Ácido araquidónico
acil-CoA	Acil coenzima A
AECOSAN	Agencia Española de Consumo y Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGIs	Ácidos grasos insaturados
AGMIs	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPIs	Ácidos grasos poliinsaturados
ALA	Ácido α -linolénico
ALT	Alanina Aminotransferasa
ANIBES	Antropometría, Ingesta y Balance Energético en España
AST	Aspartato Aminotransferasa
b*	Coordenada colorimétrica amarillo-azul
BMI	Body Mass Index (Índice de masa corporal)
BPF	Buenas prácticas de fabricación
C*	Magnitudes psicofísicas Croma
CEIPC	Comité Español Interdisciplinario de Prevención Cardiovascular
CFCA	Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos
GMP	Good Manufacturing Practices (Buenas prácticas de fabricación)
CLA	Ácido linoleico conjugado
c-LDL	Colesterol LDL
CONSORT	Consolidated Standars of Reporting Trials (Normas Consolidadas para la Publicación de Ensayos Clínicos)
COX	Ciclooxigenasa
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHGLA	Ácido dihomo γ -linolénico
DHGLA	Ácido dihomo- γ -linolénico
diHETEs	Ácidos dihidroxieicosatetraenoicos
Desv.	Desviación
dv.	Disolvente
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ENRICA	Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España
ENUCAM	Encuesta de Nutrición de la Comunidad de Madrid
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAMEs	Ésteres metílicos de los ácidos grasos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
FEN	Fundación Española de la Nutrición
FESNAD	Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética
FINUT	Fundación Iberoamericana de Nutrición
FIP	Federación Internacional Farmacéutica

FRCV	Factores de Riesgo Cardiovascular
GLA	Ácido γ -linolénico
GLC (GC)	Cromatografía gas-líquido
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica
GSH	Glutación reducido
H*	Magnitudes psicofísicas Tono
HDR	Hoja de recogida de datos
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HPETEs	Ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICC	Índice cintura-cadera
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto Nacional de Estadística
IP	Índice de Peróxidos
IQ	Índice de Quetelet
IR	Infrarrojo
ISCIH	Instituto de Salud Carlos III
ISO	Organización internacional de normalización
L*	Coordenada colorimétrica de luminosidad
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
<i>Linum</i>	
<i>usitatissimum</i> L.	Semilla de lino o linaza
LOX	Lipooxigenasa
LTB4	Leucotrieno (sintasa)
LTC4	Cisteinil-Leucotrienos
LTD4	Cisteinil-Leucotrienos
LTE4	Cisteinil-Leucotrienos
LT	Leucotrienos
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MDA	Malondialdehído
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial (Ensayo de intervención con múltiples factores de riesgo)
n-3 DPA	Ácido docosapentaenoico
n-3	Omega-3
n-6	Omega-6
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
N	Nitrógeno
OF	Oficina de Farmacia
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAD	Presión arterial diastólica
PA	Presión arterial
PAS	Presión arterial sistólica
PGD	Diagnóstico Genético Preimplantación
PGE	Prostaglandina E
PGG ₂	Prostanoide derivado del ácido araquidónico (AA) con dos enlaces dobles
PGH ₂	Endoperóxido cíclico

PGI ₂	Prostaciclina
PG	Prostaglandinas
PLC	Fosfolipasa C
PL	Fosfolipasa
PREDIMED	Efectos de la dieta mediterránea en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular
RI	Resistencia a la insulina
SDA	Ácido estearidónico
SDG	Secoisolariciresinol diglucósido
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
STROBE	Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (Directrices para la comunicación de estudios observacionales en epidemiología)
t0	Tiempo 0
t30	Tiempo 30
TA	Tensión Arterial
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEP	Tetraetoxipropano
TG	Triglicéridos
TMO	Trimetiloxonio
TMP	Tetrametoxipropano
TX	Tromboxanos
UMH	Universidad Miguel Hernández
UV	Ultravioleta
VALORNUT	Valoración Nutricional de Individuos y Colectivos
C14:0	Ácido mirístico
C15:0	Ácido pentadecílico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoleico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
AL; 18:2, n-6	Ácido linoleico
ALA; 18:2, n-3	Ácido α -linolénico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido γ -linolénico
20:0	Ácido araquídico (eicosanoico)
EPA; 20:5, n-3	Ácido Eicosapentaenoico
22:0	Ácido behénico
DHA (22:6, n-3)	Ácido Docosahexaenoico
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
LTA4	Leucotrieno A4 (epóxido)



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES
Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. DISLIPEMIAS

Las enfermedades del sistema circulatorio constituyen la primera causa de muerte en España, a pesar del continuo descenso de las tasas de mortalidad ajustadas por edad que se ha producido en la última década (ISCIII; INE, 2010) (ISCIII: Instituto de Salud Carlos III, INE: Instituto Nacional de Estadística). Aunque también se encuentran entre los principales motivos de utilización de servicios sanitarios (ISCIII, 2010), constituyen la primera causa de hospitalización y son uno de los factores más determinantes en el conjunto del gasto sanitario, siendo una importante causa de pérdida de años de vida ajustados por discapacidad (Villar Álvarez et al., 2007).

España tiene una menor mortalidad por enfermedad isquémica cardiaca que los países del centro, norte de Europa y Norteamérica, ocupando una posición intermedia-baja en cuanto a la mortalidad por enfermedad vascular cerebral. Sin embargo, se observan grandes diferencias por sexo (40% más mortalidad ajustada en los hombres que en las mujeres), que sugieren un importante potencial de prevención de estas enfermedades (Villar Álvarez et al., 2007; Rodríguez Artalejo, 2001) y la necesidad de seguir investigando la distribución de los factores de riesgo en la población. Entre los diversos factores implicados en las enfermedades cardiovasculares, la hipercolesterolemia, y principalmente los valores elevados de colesterol ligado a proteínas de baja densidad (c-LDL), se consideran factores mayores o causales (Grundy 1999; Grundy et al., 1999). Por ello, las estrategias dirigidas a lograr su control son las más eficaces. El estudio Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) demostró una relación continua y gradual (sin umbral para su comienzo) entre la colesterolemia y la mortalidad total y por cardiopatía isquémica (Stamler, 1986). Las estrategias preventivas, además de reducir la colesterolemia disminuyen la incidencia y la mortalidad por cardiopatía isquémica y la enfermedad cardiovascular en general, tanto en prevención primaria como secundaria (Labarte, 1998; Plaza Pérez et al., 2000).

Se considera que la dislipemia (colesterol \geq 250 mg/dl) contribuye en un 12% en los hombres y en un 18% en las mujeres, al total de la mortalidad por cardiopatía isquémica, explicable por factores de riesgo modificables (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2006). Es frecuente que la hipercolesterolemia se asocie a otros factores de riesgo cardiovascular, como se ha observado en diversos estudios (Banegas et al., 1993;

Maiques et al., 1995). Sin embargo, contrariamente a lo deseado, en España se ha visto que el control de las dislipemias es bajo y disminuye conforme aumenta el riesgo cardiovascular de los pacientes (Villar Álvarez et al., 2007).

Por ende, con todo lo anterior, las enfermedades cardiovasculares en nuestra población están consideradas como un problema de salud de suma prioridad (Acuerdo N° 164/2004; Decreto 212/1998), y por tanto, son objeto preferente de investigación (Escribano Hernández et al., 2010).

1.2. CALIDAD DE LOS ACEITES DE PESCADO EN CÁPSULAS: OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

Estudios observacionales llevados a cabo en poblaciones con una elevada ingesta de ácidos grasos omega-3, han reportado evidencias de una menor tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular. Este descenso puede ser consecuencia del impacto de estos ácidos grasos sobre factores de riesgo como la hipertrigliceridemia, la hipertensión arterial o la disfunción endotelial. (Lee et al., 2008; Marchioli et al., 2002; Burr et al., 1989; Albert et al., 1998).

Estas evidencias han servido de base para el desarrollo de nutracéuticos conteniendo este tipo de ácidos grasos esenciales. Estos productos, que se comercializan en Oficinas de Farmacia, son recomendables para aquellas personas que en su dieta no incluyen alimentos conteniendo estos nutrientes. No obstante, la comercialización de estos productos debe prestar especial atención a una serie de problemas que pueden mermar la calidad final de los nutracéuticos. Estos aspectos incluyen la tasa de oxidación, la composición de ácidos grasos y los aportes calóricos en la dieta.

El primero de los problemas que más preocupa a los fabricantes, hace referencia a las elevadas tasas de oxidación que presentan estos ácidos grasos cuando son aislados de sus fuentes naturales. En este sentido, la oxidación lipídica, es la reacción más preocupante que puede tener lugar durante el almacenamiento de complementos alimenticios de estos nutrientes. Al ser un fenómeno espontáneo e inevitable, conlleva una serie de cambios en la calidad final del producto, antes de llegar hasta el consumidor. Generalmente, estas cápsulas son ricas en aceites y grasas, siendo clave la protección contra la oxidación lipídica. Asimismo, la oxidación lipídica limita la vida útil de estos nutracéuticos (Li et al., 2002).

Para prevenir esta oxidación es muy importante utilizar buenas prácticas de fabricación (BPF), técnicas y materiales apropiados en sus envases, así como seleccionar y aplicar correctamente los antioxidantes más efectivos. Además, la oxidación de lípidos implica cambios que afectan al color de las cápsulas, al flavor, a la textura, así como a las características nutricionales y de seguridad finales. El peligro de los peróxidos lipídicos radica en su potencial para generar radicales libres de naturaleza orgánica, que debido a su alta reactividad podrían modificar a otros constituyentes de los alimentos, produciendo una disminución en la calidad del producto final (Delany et al., 2000).

La oxidación lipídica, es un fenómeno químico que no se puede evitar o paralizar completamente. Sin embargo, se puede disminuir de tal forma, que se obtenga un aumento significativo en la estabilidad y vida útil del producto final. El nutracéutico debe ser estable durante las diversas etapas de la producción, envasado, almacenaje, comercialización, distribución y utilización por el consumidor final, de forma segura y agradable. Este ciclo puede llevar desde pocas semanas a algunos meses, siendo esta tarea más desafiante en ambientes donde existen cambios climáticos muy marcados. La oxidación, una vez iniciada, se transforma en una reacción en cadena de difícil control, aumentando su velocidad muy rápidamente en un corto espacio de tiempo. Las moléculas ya oxidadas no pueden retornar a su estado original. Por lo tanto, este proceso no se puede revertir, pero se puede retardar o detener con el uso de antioxidantes. La oxidación en cadena, tampoco está directamente relacionada a la cantidad de moléculas susceptibles, sino de moléculas y factores catalizadores del proceso, que inician la generación de radicales libres. Para evitar la oxidación, los antioxidantes más eficaces son los que previenen la formación de radicales libres en el producto durante su manipulación (Leyton et al., 1987).

Hay que destacar que los ácidos grasos EPA (eicosapentaenoico) y DHA (docosahexaenoico), muy comercializados en este tipo de preparados, son susceptibles de sufrir oxidaciones por su abundancia en dobles enlaces, originando hidroperóxidos orgánicos. Hay estudios que ponen de manifiesto que sus productos de degradación secundaria son dañinos para las células y existe evidencia científica de que los aldehídos derivados de los lípidos son realmente citotóxicos, disminuyendo la disponibilidad de glutatión reducido (GSH). El GSH es el principal antioxidante celular, se trata de un triptido (glutamato-cisteína-glicina) que se encuentra presente en elevadas

concentraciones dentro del eritrocito (2 mM). Su función fundamental es proteger a la célula contra la acción de agentes oxidantes endógenos y exógenos, así como mantener la estabilidad de las membranas. También participa en el mantenimiento de la estructura de la hemoglobina, en la síntesis de proteínas en los reticulocitos, así como en la integridad de algunas enzimas y proteínas de membrana, llegando a ser un factor crítico para la supervivencia celular (Lee y Hwang, 2008).

EPA y DHA se oxidan más rápidamente que otros ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) como los ácidos linoleico, alfa-linolénico y araquidónico, generando productos de oxidación tóxicos. La evidencia científica muestra que EPA y DHA pueden ejercer efectos beneficiosos para reducir el riesgo vascular, sólo si se encuentran no oxidados. Además, los AGPI pueden formar radicales libres y tener un efecto prooxidante significativo, originando pérdida de vitamina E y aumento de los productos de oxidación. Diversos estudios atribuyen a los hidroperóxidos, los efectos adversos resultantes del consumo de grasas rancias (oxidadas), ya que contribuyen como sustancias altamente reactivas y tóxicas al modificar proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas *in vivo*. También, la degradación oxidativa de los ácidos grasos en las membranas biológicas, sucede análogamente a la autooxidación por reacción en cadena, mediada por radicales libres.

Además de los problemas derivados de la oxidación de los AGPI comercializados en forma de nutracéuticos, hay que prestar atención a la composición de éstos. Así, hay que considerar la naturaleza y cantidad de ácidos grasos que aparecen en la preparación, ya que estos aspectos son cruciales para obtener un correcto efecto nutricional (Li et al., 2002). En el contexto de los AGPI, la relación óptima de omega-3/omega-6, es clave en la formulación final de este tipo de nutracéuticos. De este modo, al consumir un alto contenido de ácidos grasos omega-6 y disminuir los ácidos grasos de la familia omega-3, los eicosanoides derivados a nivel celular son diferentes y ejercen funciones distintas. Una alimentación basada en animales terrestres y vegetales hace que predominen los eicosanoides de la serie 2 (prostanoides y leucotrienos), derivados del ácido araquidónico (AA). Sin embargo, una dieta rica en pescado favorece la presencia de eicosanoides de la serie 3, derivados del EPA. Los eicosanoides originados a partir de AA se encuentran normalmente en pequeñas concentraciones en el organismo, pero cuando se acumulan grandes cantidades, contribuyen a la formación de trombos y ateromas, al desarrollo de desórdenes alérgicos e inflamatorios

(particularmente en individuos susceptibles), y a la proliferación celular (British Nutrition Foundation, 1999; Calder and Yaqoob, 2009).

Las evidencias sugieren, que el consumo de omega-3 puede retardar la velocidad de formación de los eicosanoides derivados del AA, y así prevenir la acumulación y acción de éstos, al unirse a los receptores de las membranas celulares que transmiten la señal fisiopatológica a células adyacentes. En relación a los AGPI en la dieta, se puede considerar por tanto, que la presencia de éstos reemplaza en parte a los ácidos grasos saturados y disminuye su síntesis, además, provoca una reducción en los niveles circulantes de lipoproteínas y regulan la síntesis de eicosanoides de la serie 2. Tanto las recomendaciones no oficiales como la promulgada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), sugieren que la razón omega-6/omega-3 debiera ser más baja que lo que se consume actualmente (20-50:1), es decir, de (5-10:1). Sin embargo, estas cifras no están consensuadas por la comunidad científica en el momento actual, siendo éste un tema de intenso debate entre los expertos. Actualmente, la evidencia científica vincula la razón omega-6/omega-3, con cambios en la composición lipídica de la membrana vascular y con un aumento en la frecuencia de trastornos inflamatorios y riesgo vascular (Gerster, 1998; Li et al., 1999; Mantzioris et al., 1994; Burge y Calder, 2005).

Existen dudas sobre qué problemas pueden derivarse del uso de complementos alimenticios de nutrientes, productos de herbolario o de venta en grandes superficies. Por ello, actualmente, se puede considerar como un tema en el que todavía predomina el desconocimiento, aunque conviene adelantar, que son múltiples las posibilidades de interacción y muchos los problemas de salud derivados del consumo de ellos. Posiblemente, en algunos casos (como es el caso de los complementos alimenticios de AGPI) la interacción con la dieta, sobre todo si ésta es pobre en ácidos grasos esenciales, podrá repercutir en una eficacia terapéutica mejorada gracias al complemento alimenticio, lo que podría permitir diseñar terapias optimizadas.

En este contexto, el consumo de complementos alimenticios o cápsulas de diferentes tipos de aceite de pescado, ajo o calabaza, es cada vez más frecuente en la población y muchas veces se realiza por automedicación y sin control médico. Además, todo esto se encuentra agravado por el hecho de que muchos consumidores no informan a sus médicos y profesionales sanitarios, del consumo concomitante con terapias farmacológicas.

Finalmente, otro aspecto a considerar en estos complementos alimenticios, es el aprovechamiento energético. La grasa almacenada en forma de triglicéridos (TG), representa la fuente de energía más concentrada dentro de las células, ya que los TG son anhidros. El rendimiento energético de un gramo de grasa catabolizada es de 9 Kcal (37,7 KJ/g), comparado con las 4 Kcal (16,8 KJ/g) de las proteínas y los hidratos de carbono.

Los ácidos grasos producen energía mediante la β -oxidación en las mitocondrias. En general, el proceso de β -oxidación no es muy eficiente ya que requiere transporte a la mitocondria mediante el sistema enzimático dependiente de la carnitina, que consta de cuatro pasos. Por consiguiente, los ácidos grasos son más lentos para producir energía que los hidratos de carbono, y por ello no son la opción a movilizar en primer lugar por la célula cuando se requiere producir energía. Por esta razón, son almacenados como reserva preferentemente en el tejido adiposo para ser utilizados con posterioridad por otros tejidos. En aquellas personas que siguen dietas ricas en grasas y que presentan una ingesta calórica excesiva, la mayor parte de los ácidos grasos de la dieta se almacenan rápidamente en este tejido, acumulándose en exceso y originando una situación patológica conocida como obesidad. Además, la β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, como los poliinsaturados, se lleva a cabo inicialmente en los peroxisomas y no es muy eficiente, ya que produce peróxidos de hidrógeno como producto secundario en su primera reacción (Leyton et al., 1987). Esta reacción es catalizada por la acil-CoA (acil coenzima A) oxidasa, mientras que en la peroxidación mitocondrial la enzima que cataliza este paso es la acil-CoA deshidrogenasa, produciendo NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido) que es reciclado a NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado) en la cadena respiratoria mitocondrial.

Las reacciones oxidativas de los lípidos, son un conjunto de reacciones químicas (autooxidación) tanto primarias (formación de peróxidos lipídicos) como secundarias (compuestos volátiles aromáticos), en los que el oxígeno molecular reacciona con los ácidos grasos libres generados en la hidrólisis enzimática. La composición de los lípidos influye en la oxidación lipídica, así los AGI (ácidos grasos insaturados) se oxidan más rápidamente que los saturados y ambos se oxidan a una velocidad más rápida cuando están en forma libre que cuando están esterificando al glicerol. Otros parámetros que influyen sobre la velocidad de reacción son: el número, la posición y la geometría de los

dobles enlaces (los enlaces cis se oxidan más que los trans y los dobles enlaces conjugados son más reactivos que los no conjugados) (Flores, 1997).

1.3. FORMACIÓN DE EICOSANOIDES Y DOCOSANOIDES

La formación de eicosanoides es una función biológica importante de los AGPI C-20 de las familias n-6 (omega-6) y n-3 (omega-3). Los eicosanoides incluyen los prostanooides de estructura cíclica y los leucotrienos (LT) de estructura lineal. Los primeros incluyen a las prostaglandinas (PG), prostaciclina (prostaglandina I₂ o PGI₂) y tromboxanos (TX). Existen 2 rutas principales catalizadas por 2 enzimas clave: la ruta de la ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de los distintos prostanooides, y la ruta de la lipooxigenasa (LOX), a través de la que se sintetizan los LT. La serie 2, derivada del AA, es considerada como una de las más importantes, ya que este ácido graso es muy abundante, presentándose esterificado en la posición 2 del glicerol de la mayoría de las moléculas de fosfolípidos. En este sentido, el AA puede conectar tanto con la ruta de la COX como con la de la LOX. Además, el AA puede participar en otras rutas metabólicas de síntesis de eicosanoides, como, por ejemplo, la ruta de oxidación por el citocromo P-450, rindiendo epóxidos, ácidos hidroxitetraenoicos (HETEs) y ácidos dihidroxitetraenoicos (diHETEs). El AA también puede sufrir oxidaciones no enzimáticas por radicales libres a compuestos cíclicos semejantes a las prostaglandinas, denominados isoprostanos (FAO & FINUT, 2012).

La actividad ciclooxigenasa se localiza en la fracción microsomal de la mayoría de las células, destacando 2 isoformas principales: la COX-1 y la COX-2. La COX-1 tiene una expresión constitutiva, mientras que la COX-2 es inducible por factores de crecimiento y citoquinas. La COX-1 es inhibida por el ácido acetyl salicílico (principio activo de la aspirina) y antiinflamatorios no esteroideos, mientras que la COX-2 es inhibida por corticoides. Las COX producen PGG₂ a partir de AA (Lee y Hwang, 2008). La PGG₂ se transforma en PGH₂ por acción de una peroxidasa dependiente de GSH. La PGH₂ es la molécula precursora del resto de prostanooides a partir de enzimas específicas de tejidos. Excepcionalmente, el pulmón posee todas las enzimas y por ello puede sintetizar toda la gama de prostanooides. En el otro extremo estarían las plaquetas que sólo pueden sintetizar PGD y TX, mientras que el endotelio vascular sintetiza PGE y PGI₂. La LOX también posee varias isoformas. Se trata de dioxigenasas que producen hidroperóxidos del ácido eicosatetraenoico (HPETEs) a partir de AA (Smith et al.,

1991; Samuelson, 1987). Las actividades LOX se encuentran en el citosol de algunos tipos celulares circulantes. Así, en neutrófilos se encuentra la LOX-5 (activada por Ca^{2+}) y la LOX-12, los eosinófilos contienen LOX-15 y las plaquetas la LOX-12. Los HPETEs son reducidos a HETEs que son compuestos más estables y precursores de los distintos LT. Así por ejemplo, el 5-HPETE producido por la LOX-5 es convertido en LTA₄, LTB₄ (inactivo), LTC₄, LTD₄ y LTE₄ en los leucocitos y otros tipos celulares. Los HETEs son potentes agentes quimioatrayentes y regulan la migración leucocitaria. Por su parte, los LT son potentes constrictores de músculo liso a nivel bronquial e intestinal. Tanto los HETEs como los LT juegan un papel fundamental en la inflamación porque, a diferencia de otros eicosanoides, tienen una vida media más larga (varias horas) en el tejido donde se sintetizan.

Además del AA, existen otros precursores de eicosanoides como el EPA y el ácido dihomo γ -linolénico (DHGLA). Los eicosanoides originados a partir del AA y del EPA son biológicamente más activos e importantes que los derivados del DHGLA. Estos ácidos grasos se liberan de los PL de la membrana celular por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), enzima especializada en cortar el enlace éster del ácido graso en posición 2 de la molécula de glicerol de los fosfolípidos. Una ruta alternativa sería la de la fosfolipasa C (PLC), enzima que elimina el grupo polar fosforilado del fosfolípido rindiendo un diacilglicerol. Posteriormente, éste entra en contacto con la diacilglicerol lipasa, que libera el ácido graso en posición 2 de la molécula de glicerol. Por ello, el AA y el EPA compiten por las mismas enzimas y, por lo tanto, los niveles relativos de los productos formados dependen de las concentraciones de AA y EPA de la membrana celular. Las membranas celulares suelen contener una alta proporción de AA y unas proporciones bajas de EPA y DHA y, por lo tanto, el AA es el sustrato dominante para la síntesis de eicosanoides. Sin embargo, un alto consumo de EPA o DHA puede disminuir la producción de eicosanoides derivados del AA (Corey et al., 1983; Culp et al., 1979).

Además de los eicosanoides, en los últimos años se ha identificado un nuevo grupo de mediadores formados a partir del EPA por la COX-2, denominados resolvinas de serie E (Serhan et al., 2000) (figura 1). El DHA no es un sustrato muy específico para la COX y, por lo tanto, no se conocen derivados bioactivos del mismo DHA. Los derivados del DHA originados por la COX-2 y la 5-LOX se han denominado resolvinas

de serie D y protectinas (neuroprotectinas D1), recibiendo el término genérico de docosanoideos (Serhan et al., 2002; Bazan, 2007; Lee y Hwang, 2008) (figura 1).

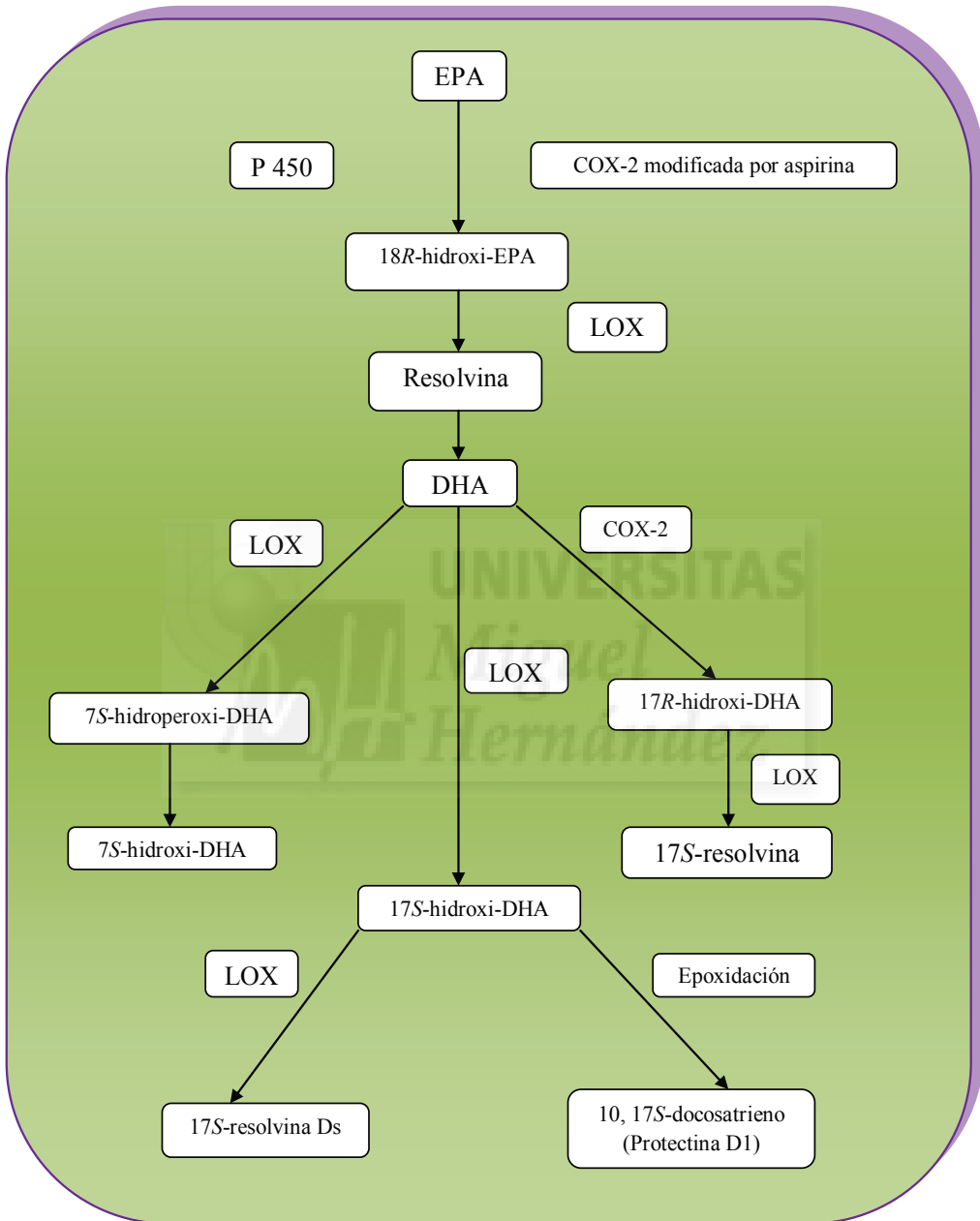


Fig. 1. Rutas metabólicas para la transformación de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) en resolvinas y protectinas. Ciclooxigenasa (COX); lipooxigenasa (5-LOX)

1.4. INTERÉS NUTRICIONAL Y TERAPÉUTICO DE CÁPSULAS CONTENIENDO ACEITE OMEGA-3/OMEGA-6

Los ácidos grasos esenciales y el interés por los mismos se han venido documentando cuando Burr y Burr (1929) propusieron el papel esencial de los ácidos grasos, tras la experimentación en ratas con una dieta baja en grasa, teorizando sobre la necesidad del ácido linoleico para la prevención de enfermedades. Fue Sinclair (1956), quien posteriormente propuso que la deficiencia relativa de AGPI omega-3 se asociaba con la prevalencia de algunas enfermedades cardiovasculares (ECV), como la enfermedad coronaria. Sin embargo, no fue hasta la década de los años 70, cuando (Bang et al., 1971; Dyeberg et al., 1975) dirigieron una serie de estudios en la población inuit de Groenlandia, en los que observaron que, a pesar de seguir una dieta alta en grasa, esta población presentaba una menor prevalencia de aterosclerosis y ECV. Siendo la diabetes prácticamente desconocida en esta población indígena, los investigadores identificaron un perfil lipídico plasmático distinto cuando los comparaban con dos poblaciones control, una población inuit que vivía en Dinamarca y la otra, una población danesa. Esas diferencias radicaban principalmente en las concentraciones circulantes de omega-3 y omega-6, atribuyéndose éstas a la dieta, la cual propiciaba una concentración elevada de EPA que actuaba como un factor protector frente a las ECV.

En consecuencia, el interés en los AGPI ha ido en aumento desde entonces. Se sabe, que constituyen las bases de las membranas celulares particularmente de las neuronas en el cerebro, que están implicadas en los procesos de transformación energética y que regulan la información que fluye entre las células. Los AGPI son ácidos grasos de 20 o 22 átomos de carbono, con varios dobles enlaces derivados metabólicamente de los ácidos grasos esenciales linoleico y α -linolénico. Los principales derivados del α -linolénico son el EPA y el DHA, comúnmente conocidos como omega-3. A pesar de que es posible sintetizar AGPI en el organismo, mediante la acción de elongasas y desaturasas, especialmente en algunos órganos como el intestino, el hígado y el cerebro, la actividad enzimática es relativamente baja y por tanto su producción es limitada. Es por ello que algunos AGPI, como el DHA, pueden considerarse esenciales, principalmente en recién nacidos y durante la vejez (Gil, 2013).

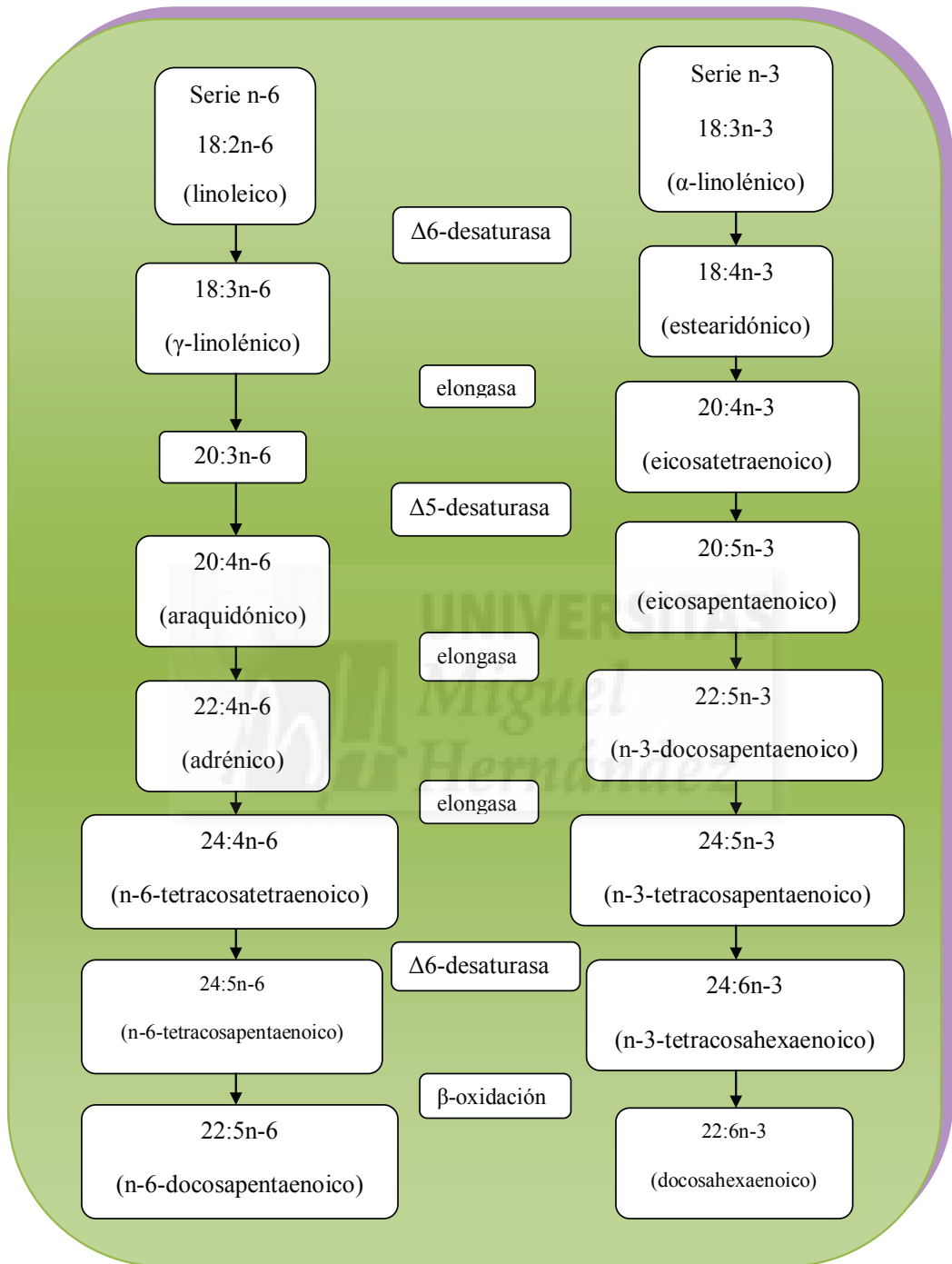


Fig. 2. Rutas metabólicas para la transformación de los ácidos linoleico y α -linolénico de la dieta en los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

García Gabarra y Dalmau Serra (2016), teniendo en cuenta las propiedades saludables del DHA, han sugerido que se pueden distinguir entre las siguientes declaraciones aplicables a diversos alimentos fuentes de DHA y dirigidos a:

- Adultos, sobre el funcionamiento normal del cerebro y el mantenimiento de la visión en condiciones normales.
- Mujeres embarazadas y madres en periodo de lactancia, sobre el normal desarrollo de los ojos y el cerebro del feto y del lactante amamantado.
- Lactantes entre 6 y 12 meses que toman un preparado de continuación, sobre el normal desarrollo visual y nervioso hasta los 12 meses.

A lo largo de las distintas etapas de la vida, la inclusión de AGPI como el EPA o el DHA en la dieta, ha demostrado tener un efecto positivo en el perfil lipídico, pudiendo ayudar a reducir los TG en plasma (Shaikh et al., 2014) y, por tanto, a disminuir el riesgo de ECV. Siendo destacable, dentro de los posibles mecanismos de protección cardiovascular la reducción de la presión arterial (PA) (Miller et al., 2014), las propiedades antitrombóticas, el efecto antiinflamatorio y antiarrítmico, la capacidad de mejorar la función endotelial, el aumento de la estabilidad plaquetaria y la mejora frente a la resistencia a la insulina (RI) (Hooper et al., 2004; Skilton et al., 2012). Del mismo modo, los AGPI son también precursores de distintas moléculas con efectos a menudo opuestos entre sí, como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, resolvinas, y protectinas, que regulan la inmunidad, la agregación plaquetaria y la inflamación, entre otros.

Tabla 1. AGPI omega-6 importantes a nivel nutricional

Nombre común	Nombre sistemático	Nomenclatura omega (abreviatura)	Fuentes principales
Ácido linoleico	Ácido cis-9, cis-12-octadecadienoico	18:2n-6 (LA)	La mayoría de aceites vegetales
Ácido γ -linolénico	Ácido cis-6, cis-9, cis-12-octadecatrienoico	18:3n-6 (GLA)	Aceites de semillas de onagra, borraja y grosella negra
Ácido dihomo- γ -linolénico	Ácido cis-8, cis-11, cis-14-eicosatrienoico	20:3n-6 (DHGLA)	Componentes en cantidad mínima de tejidos animales
Ácido araquidónico	Ácido cis-5, cis-8, cis-11, cis-14-eicosatrienoico	20:4n-6 (AA)	Grasas animales, hígado, lípidos del huevo, pescado
Ácido docosatetraenoico	Ácido cis-7, cis-10, cis-13, cis-16-docosatetraenoico	22:4n-6	Componentes en cantidad mínima de tejidos animales
Ácido docosapentaenoico	Ácido cis-4, cis-7, cis-10, cis-13, cis-16-docosapentaenoico	25:5n-6 (DPA)	Componentes en cantidad mínima de tejidos animales

Tabla 2. AGPI omega-3 importantes a nivel nutricional

Nombre común	Nombre sistemático	Nomenclatura omega (abreviatura)	Fuentes principales
Ácido α -linolénico	Ácido cis-9, cis-12-cis-15-octadecatrienoico	18:3n-3 (ALA)	Aceites de lino, perilla, canola y soja
Ácido estearidónico	Ácido cis-6, cis-9, cis-12, cis-15-octadecatetraenoico	18:4n-3 (SDA)	Aceites de pescado, aceite de soja modificado genéticamente, aceite de semilla de grosella negra y aceite de cáñamo
---	Ácido cis-8, cis-11, cis-14, cis-17-eicosatetraenoico	20:4n-3	Componentes en cantidad mínima de tejidos animales
Ácido eicosapentaenoico	Ácido cis-5, cis-8, cis-11, cis-14-cis-17-eicosapentaenoico	20:5n-3 (EPA)	Pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano y caballa)
Ácido docosapentaenoico	Ácido cis-7, cis-10, cis-13, cis-16, cis-19-docosapentaenoico	22:5n-3 (n-3 DPA)	Pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano y caballa)
Ácido docosahexaenoico	Ácido cis-4, cis-7, cis-10, cis-13, cis-16, cis-19-docosahexaenoico	22:6n-3 (DHA)	Pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano y caballa)

Tabla 3. Acciones fisiológicas de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico (AA)

EICOSANOIDE	ACCIÓN FISIOLÓGICA
PGE ₂	Proinflamatoria, proagregatoria, reprime la respuesta inmunitaria, promueve el crecimiento y la proliferación celular, la vasodilatación y la broncoconstricción
	Antiinflamatoria leve (inhibe la 5-LOX y así disminuye la formación de la serie 4 del LT, produce la 15-LOX que promueve la formación de lipoxinas antiinflamatorias)
PGI ₂	Antiinflamatoria, inhibe la agregación plaquetaria y es un potente vasodilatador
TXA ₂	Potente agregante plaquetario y potente vasoconstrictor
PGD ₂	Inhibe la agregación plaquetaria, vasodilatación, produce sueño
PGF _{2α}	Induce la contracción del músculo liso y del útero
LTB ₄	Proinflamatoria, produce agregación de neutrófilos y quimiotaxis de neutrófilos y de eosinófilos
LTC ₄	Proinflamatoria, promueve la permeabilidad de las células endoteliales, contrae las células del músculo liso y estrecha las vías respiratorias periféricas
LTD ₄	Contrae las células del músculo y estrecha las vías respiratorias periféricas
12-HETE	Quimiotaxis de neutrófilos, estimula la secreción de insulina inducida por la glucosa
15-HETE	Inhibe las lipooxigenasas 5 y 12
Lipoxina A	Genera aniones superóxido, quimiotaxis
Lipoxina B	Inhibe la actividad de los linfocitos NK (citotóxicos naturales)

Tabla 4. Acciones fisiológicas de los eicosanoides derivados del EPA y de los docosanoides derivados del DHA

EICOSANOIDE/DOCOSANOIDE	ACCIÓN FISIOLÓGICA
PGE ₃	Antiagregante leve y vasodilatador
PGI ₃	Antiagregante leve
TXA ₃	Proagregante muy leve
Resolvina E1	Potente antiinflamatorio
Resolvina D	Potente antiinflamatorio
Protectina D1	Potente antiinflamatorio

Conscientes del elevado número de publicaciones y evidencias científicas relacionadas con los AGPI omega-3 y las ECV, su uso no se ha restringido solamente a ello. Diferentes estudios, primero en animales y posteriormente en humanos (Kim et al., 2000), demostraron su papel neuroprotector y observaron la asociación entre concentraciones elevadas de omega-3 y una menor incidencia de algunas enfermedades mentales como depresión (Mocking et al., 2016) y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Eriksdotter et al., 2015). Además, la importancia del DHA en el desarrollo del sistema nervioso central ha contribuido a generar mayor interés debido a su correlación con distintas funciones como la neurogénesis, la neurotransmisión y la protección contra el desequilibrio oxidativo (Innis, 2007b). La evidencia científica ha mostrado que la inclusión de omega-3 en la dieta, parece tener un beneficio neuroprotector y proporciona propiedades capaces de modular la neurobiología, ambas de gran interés en el proceso de envejecimiento (Dangour y Uauy, 2008).

Actualmente, se conocen con especial grado de detalle las necesidades nutricionales de la especie humana a lo largo de las distintas etapas de la vida, de tal forma que los organismos expertos emiten recomendaciones concretas de nutrientes para distintos grupos de población en función de factores como la edad, el sexo o determinadas condiciones fisiológicas e incluso patológicas. Tales necesidades se cubren favorablemente a través de una dieta equilibrada y variada, acompañada a su vez por unos hábitos de vida saludable. Por tanto, los esfuerzos deben ir encaminados a educar a la población en este ámbito, para así alcanzar y mantener un adecuado estado de salud.

Durante la etapa adulta, los AGPI de la serie omega-3 son también fundamentales, por los beneficios ampliamente demostrados para la salud humana. Entre las funciones más estudiadas de los omega-3 destacan las relacionadas con la

salud cardiovascular. Se conoce que las poblaciones con una mayor ingesta de ácidos grasos omega-3 tienen una menor tasa de mortalidad por ECV, debido probablemente al impacto de estos ácidos grasos sobre factores de riesgo como el exceso de TG, la tensión arterial elevada o la alteración de la función endotelial. Por ello, algunos organismos expertos como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o la Organización Mundial de la Salud (OMS) han emitido recomendaciones concretas para los AGPI omega-3 (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2010; FAO y WHO, 2008).

El consumo de pescado azul de forma habitual, permite alcanzar una ingesta adecuada de AGPI omega-3. Aunque diferentes estudios muestran que la población no alcanza las ingestas recomendadas. Por su parte, la OMS, en su último informe sobre grasas en la alimentación humana, concluía que la sustitución de grasas saturadas por grasas mono y poliinsaturadas, es una estrategia nutricional adecuada para controlar factores de riesgo de ECV (FAO y WHO, 2008).

1.5. INTERÉS NUTRICIONAL Y TERAPÉUTICO DE LA SEMILLA DE LINO

La semilla de lino o linaza (*Linum usitatissimum* L.) es un cultivo ancestral que se ha utilizado como fibra y en productos alimentarios. En América del Norte, “flaxseed” es el término preferido para el lino que se utiliza para consumo humano, mientras que los europeos utilizan el término “linseed” para el lino comestible (Vaisey-Genser y Morris, 2003). Los registros históricos indican que la linaza se remonta a alrededor de 9000-8000 a. de C. en Turquía (van Zeiste, 1972), Irán (Helbaek, 1969), Jordania (Hopf, 1983; Rollefson et al., 1985) y Siria (Hillman, 1975). El cultivo de la linaza fue alrededor de 7000-4500 a. de C. (revisado en Vaisey-Genser y Morris, 2003; Zohary y Hopf, 2000). Probablemente, el primer uso que se hizo de la semilla de lino como alimento fue en forma de ingrediente en los panes (Stitt, 1994) y como laxante (Judd, 1995).

La linaza crece en aproximadamente 50 países, la mayoría de los cuales se encuentran en el hemisferio norte. En 2002, Canadá fue el mayor productor de semillas de lino, que representó aproximadamente el 33% de las 2 millones de toneladas producidas, seguido de China (20%), Estados Unidos (16%) e India (11%) (Berglund, 2002). La historia muestra que la linaza se ha utilizado como ingrediente en el desayuno

en forma de cereales y panes. Sin embargo, desde la década de 1990, varios productos que contienen linaza se han desarrollado principalmente para introducirse en el mercado de alimentos saludables. El interés se debe a hallazgos que sugieren que la linaza puede proporcionar una variedad de beneficios para la salud (Thompson y Cunnane, 2003) gracias a componentes como los lignanos (secoisolariciresinol diglucósido [SDG] que es la forma predominante), ALA (ácido α -linolénico) y polisacáridos no amiláceos (goma o fibra).

La linaza, es una semilla oleaginosa que contiene aproximadamente 38-45% de aceite. El AGPI ALA representa el 52% de los ácidos grasos en el aceite. La linaza es también una fuente rica de lignanos vegetales (hasta 13 mg/g de linaza).

Tabla 5. Distribución de TG en la linaza^{a,b}

Triacilgliceroles			
(TG)	%	(TG)	%
LnLnLn	30,4	OLnP	3,1
LaLnLn	18,7	LnLaP	3,0
OLnLn	13,5	SLaLa	1,1
LnLnP	6,9	OLaLa	1,0
OLaLn	5,9	LaLaLa	0,9
LaLaLn	5,3	OLaO	0,8
OLnO	4,2	LaOP	0,6
SLnLn	4,1	PLnP	0,5

^aAdaptada de Holcapek et al., (2004); ^bP, ácido palmítico; S, ácido esteárico; O, ácido oleico; La, ácido linoleico; Ln, ácido linolénico

El interés en el ALA y los lignanos como ingredientes alimentarios, ha abierto oportunidades para la utilización de la linaza en la matriz de ciertos alimentos. En cambio, no se observa el mismo interés para otros componentes de la linaza, como las proteínas, que representan el 20% de la misma (Carter, 1993).

1.6. INGESTAS RECOMENDADAS Y VALORES DE REFERENCIA PARA ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Aunque no existe un amplio consenso en relación con las recomendaciones para la ingesta de grasas, como se pone de manifiesto al comparar las publicadas por la OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), o las propias españolas (tabla 6). Esta heterogeneidad se refiere a los propios valores, y a la metodología y

criterios para establecerlas. Es más, no es hasta el año 2012 cuando de manera general se establecen recomendaciones para EPA+DHA.

La OMS, ha establecido unas recomendaciones de 250 mg/día de EPA+DHA en adultos, y de 300 mg/d (200 mg/día provenientes de DHA) en el caso de mujeres embarazadas o lactantes. Igualmente, la OMS considera que, en el caso de la población vegetariana y no consumidora de pescado, es conveniente realizar una ingesta adecuada de ácido α -linolénico a partir de aceites de semillas, para que pueda convertirse potencialmente en EPA en el organismo.

Por su parte, la Asociación Americana del Corazón (AHA) recomienda el consumo de pescado (al menos 2 veces por semana, y fundamentalmente graso) a la población general, como una decisión de salud nutricional de gran importancia vital. Lo anterior implicaría, de acuerdo a la misma AHA, un aporte medio de unos 3 g de EPA+DHA a la semana o aproximadamente 400 mg/día. Al mismo tiempo, la AHA propuso elevar las ingestas de EPA+DHA hasta 1g/día en el caso de personas con historia clínica de ECV.

En Reino Unido, la Foods Standard Agency ha establecido unas recomendaciones de ingesta para hombres de EPA+DHA de 500 mg/día y 400 mg/día para las mujeres. En Francia, las recomendaciones son similares a las de Gran Bretaña, mientras que en Holanda se propone un valor medio de 450 mg/día.

La EFSA, por su parte, propone un valor de ingesta adecuada para la suma de EPA y DHA de 250 mg/día o el consumo de al menos dos raciones semanales de pescado (preferiblemente pescado azul) para la población adulta, y de 100 mg/d de sólo DHA en el caso de niños con edad entre 7-24 meses. En situaciones fisiológicas especiales, embarazo y lactancia, la ingesta recomendada para adultos debería incrementarse en 100-200 mg/día de DHA.

En España, en el reciente Consenso sobre las Grasas y Aceites en la Alimentación de la Población Española Adulta (2015), desarrollado desde la FESNAD (Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética), se propone como ingesta deseable de AGPI omega-3 de cadena larga para la población española un 0,1-1,0% de la energía diaria (0,25-2,25 g), obtenidos a partir del consumo de pescado azul, y preferentemente de tamaño pequeño (arenque, caballa, sardina, salmonete, etc.), con el fin de evitar la posible ingesta elevada de contaminantes como

mercurio y dioxinas, más presentes en especies grandes como el atún y el pez espada. Esta recomendación de ingesta deseable está basada en el nivel de evidencia de reducción de eventos cardiovasculares asociados al consumo de pescado y aceites de pescado. En el caso de la reducción de factores de riesgo cardiovascular (hipertrigliceridemia, hipertensión, restenosis arterial), la recomendación del documento FESNAD es la de ingerir entre 2-4 g de aceite de pescado con alto contenido en EPA y DHA, siempre que se trate de casos con hipertrigliceridemia grave y resistente a los tratamientos convencionales.

Otro aspecto, también interesante, se refiere tanto a las cantidades absolutas de EPA y DHA que deben ingerirse en los diferentes grupos de edad y situaciones fisiológicas, como a las sinergias y antagonismos con otros componentes de la dieta. Siendo en este sentido, probablemente, la cuestión más evaluada y también controvertida, la relación de la ingesta omega-6/omega-3. Basándose en lo saludable de la dieta de los antiguos homínidos, muy rica en AGPI omega-3 y relativamente pobre en AGPI omega-6, la situación actual apunta a una inversión con una creciente ingesta de omega-6 en la alimentación occidental, incluyendo la española. La competición entre estos ácidos grasos para la vía metabólica de los eicosanoides, con generación potencial de compuestos presuntamente pro-inflamatorios, ha alertado sobre la necesidad de limitar la ingesta de omega-6 procedente de semillas, aceites y sus derivados, y aumentar la de ácidos grasos omega-3 de fuentes vegetales y pescado para conseguir un cociente omega-6/omega-3 inferior a 5:1 en la dieta habitual. (FEN & FINUT, 2015).

Tabla 6. Ingestas recomendadas de DHA según la edad

Población	OMS (2003)	FAO/FINUT (2008)	EFSA (2010)	EFSA (2013)	EFSA (2014)	FESNAD
Niños 10-18 años	1-2% de energía diaria	EPA + DHA 250 mg/d	EPA + DHA 250 mg/d	NA	NA	NA
Adultos	1-2% de energía diaria	EPA + DHA 250 mg/d	EPA + DHA 250 mg/d	NA	NA	0,1-1,0% de la energía diaria (0,25-2,25 g), obtenidos a partir del consumo de pescado azul, preferentemente de pequeño tamaño (arenque, caballa, sardina, salmonete, etc.)
Embarazo y lactancia	1-2% de energía diaria	EPA + DHA 300 mg/d de los que DHA \geq 200 mg/d	DHA adicional 100-200 mg/d	NA	NA	NA

DHA: ácido docosahexaenoico; EFSA: European Food Safety Authority; EPA: ácido eicosapentaenoico; FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; FESNAD: Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética; FINUT: Fundación Iberoamericana de Nutrición. NA: No aplicable. (FEN & FINUT, 2015).

1.7. INGESTAS ACTUALES DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3

Tras una exhaustiva revisión de la bibliografía existente, resulta más que curioso que existan muy pocos estudios que se hayan ocupado de la cuantificación individualizada del EPA y DHA, siendo la mayoría de los datos los correspondientes a la proporción de los mismos en el conjunto de los AGPI. Seguidamente, se exponen los datos más recientes derivados de estudios llevados a cabo en España, así como una breve comparación con el resto de Europa y del mundo. En una reciente revisión del año 2015 se hace una evaluación de la ingesta en 266 países, focalizándose la misma en el consumo de pescado, ya que como se ha mencionado, se puede considerar como un buen marcador indirecto de la ingesta de EPA y DHA. Los resultados en esta revisión

indican que los principales países consumidores serían los del Pacífico Asiático, destacando Japón, mientras que los de menor consumo serían los de Centroamérica, Asia Central, o los del África subsahariana. En el caso de Europa, se observa una gran variación, correspondiendo los mayores consumos a España y Portugal, y muy bajo en general en países como Alemania, Holanda, o los del Este de Europa en general. Así, las ingestas medias publicadas por EFSA en el año 2010, muestran un rango entre 80-420 mg/día (EPA+DHA). En el caso de España, cuya posición en los primeros puestos de consumo de EPA+DHA es destacada, cuando se realiza la evaluación en base a la distribución de la población española para los diferentes estudios, se refieren porcentajes importantes que no alcanzan las recomendaciones.

En la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética en España (ENIDE), llevada a cabo por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en el año 2011, se refieren unos valores poco satisfactorios, ya que sólo entre el 12-20% de la población, alcanza los objetivos nutricionales. En la cohorte del estudio PREDIMED (Estruch et al., 2013), en el principal estudio de intervención con Dieta Mediterránea llevado a cabo en el país, los datos obtenidos mediante cuestionario de frecuencia de consumo en 7447 individuos con alto riesgo cardiovascular y edad superior a 55 años, muestran un consumo basal medio de EPA+DHA de 800 mg/día, correspondiente a un 0,6% de la energía diaria. Estas cantidades son sensiblemente superiores a los valores publicados en el mencionado estudio ENIDE para población española de 17 a 60 años. En este estudio se indicó que la suma de EPA+DHA (550 ± 580 mg/día) no superaba los 500 mg/día en el 65% de la población analizada. Resultan también muy interesantes, los resultados obtenidos por el Grupo VALORNUT (Ortega et al., 2013) en el año 2013 sobre fuentes alimentarias y adecuación de la ingesta de AGPI omega-3 y omega-6 en una muestra representativa de adultos españoles. En este estudio, se incluyeron 1068 adultos (521 varones y 547 mujeres) de 17 a 60 años, seleccionados en diez provincias españolas, que constituyen una muestra representativa de la población a nivel nacional. El aporte de AGPI omega-3 resultó ser especialmente bajo ($1,85\pm 0,82$ g/día), proporcionando menos del 1% de la energía en la mayoría de los individuos encuestados. De manera específica, la suma de EPA+DHA fue de $0,55\pm 0,58$ g/día. Las principales fuentes alimentarias de AGPI omega-3 fueron los pescados, seguidos de carnes, lácteos y grasas/aceites. De manera significativa, las personas que tomaban menos de 0,5 raciones/día presentaban ingestas de omega-3 ($1,46\pm 0,57$ g/día) y de

EPA+DHA ($0,19 \pm 0,19$ g/día) significativamente inferiores a las de individuos con mayor consumo de pescado. Del mismo modo, se observaba un incremento en la ingesta de omega-3 con la edad, tendencia habitual en la mayoría de los estudios analizados, lo que suele deberse al mayor consumo de pescado en los colectivos de personas de la tercera edad. Por otra parte, los datos no publicados del estudio ENRICA (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España) señalan una ingesta de EPA+DHA del 0,4% y 0,5% de la energía en personas de menos o más de 60 años, respectivamente. Más recientemente, desde la FEN (Federación Española de Nutrición) se ha coordinado el estudio ANIBES (Antropometría, Ingesta y Balance Energético en España) (Ruiz et al., 2015a; 2016b), en una muestra representativa de la población española de entre 9-75 años. En este estudio, los AGPI han supuesto aproximadamente el 6,6 % de la ingesta total de energía, sin diferencias entre los sexos y grupos de edad, mientras que los AGPI omega-3 englobaron el 0,63% del total de la energía de la población ANIBES, incrementándose con la edad. La ingesta media en el conjunto de la población del estudio ANIBES (9-75 años) ha sido de $1,3 \pm 11,6$ g/día ($1,6 \pm 16,3$ g/día para los hombres y apenas $1,0 \pm 0,7$ g/día en las mujeres). Sin embargo, destaca la baja ingesta media observada en el grupo de 9-12 años: $0,9 \pm 0,5$ g/día, siendo de nuevo menor en la población femenina. Igualmente, la población adolescente (13-17 años) participante en el estudio ANIBES muestra valores de ingesta reducidos ($1,0 \pm 0,6$ g/día), algo mayores en los hombres que en las mujeres.

En lo que a fuentes alimentarias se refiere, el grupo de los pescados y mariscos es la principal fuente de AGPI omega-3 en adultos y personas mayores, ocupando la segunda posición tras el subgrupo de la carne en niños y adolescentes. En este sentido, y como se viene observando también en otros estudios, hay que llamar la atención sobre la marcada disminución en el consumo de pescado en el conjunto de la población española, pero de manera muy especial en los más jóvenes. En los datos disponibles a partir del Panel de Consumo Alimentario del MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), y en lo referente a los aspectos nutricionales que viene haciendo en su evaluación la FEN, los datos obtenidos durante los años estudiados (2000-2010), el 0,5-0,6% del total de la energía ingerida, se ajustaba a las recomendaciones realizadas por la FAO/OMS, pero no a las realizadas para la población española por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). En éstas se recomienda un consumo de AGPI omega-3 algo superior (1-2%). Como dato adicional

interesante, la evolución de la alimentación española de acuerdo también al Panel de Consumo Alimentario, refleja un marcado desplazamiento del cociente omega-6/omega-3 (16,6/1 en el año 2000; 12/8 en el año 2010) frente a lo recomendado (5/1). Aunque se observa una tendencia a mejorar en los últimos años, la relación todavía sigue desplazada a favor de los omega-6. También, son recientes los resultados de la Encuesta de Nutrición de la Comunidad de Madrid (ENUCAM, 2014), desarrollada por la FEN, conjuntamente con la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. En la misma, a partir de los resultados obtenidos por registro dietético, el consumo medio de AGPI omega-3 de la población de estudio se encuentra dentro de las recomendaciones (0,250 – 2 g/día; conforme a F AO/OMS, 2008), con $1,14 \pm 0,94$ g/persona/día. Se observan diferencias entre sexos, con 1,23 g/persona/día en los hombres y 1,06 g/persona/día en las mujeres. La relación omega-6/omega-3 para la población madrileña sería de 8,1/1, desplazada hacia los omega-6, pero en menor medida que hace unos años. En la encuesta ENUCAM, también se ha empleado el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos para el estudio de la dieta. En este último caso, los valores obtenidos han sido de $1,98 \pm 1,11$ g/persona/día ($2,02$ g/persona/día en los hombres y $1,94$ g/persona/día en las mujeres). La relación omega-6/omega-3 en este caso, sería de 6,1/1. El registro dietético (recordatorio de 24h), consta de un patrón de consumo por grupos de alimentos y bebidas y una distribución energética a lo largo del día. Sin embargo, el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) consta de un patrón de consumo por grupos de alimentos y bebidas, así como la frecuencia de consumo de los mismos. Todos estos resultados ponen de manifiesto que, en conjunto, se aprecia una peor situación en cuanto a la ingesta en los grupos de edad más jóvenes. Lamentablemente, no existen datos representativos en la edad pediátrica, y ello a pesar de la evidencia científica probada de la importancia crítica de estos ácidos grasos en las primeras etapas de la vida y del crecimiento. En este sentido, resulta muy destacable el denominado estudio ALSALMA (Dalmau et al., 2015), que se ha llevado a cabo en el año 2015. Se trata de un análisis cuantitativo de la ingesta de nutrientes en niños menores de 3 años, estratificada también la población en: menores de 6 meses, 7-12 meses, 13-24 meses, 25-36 meses. La muestra total ha estado constituida por 1701 niños. La información disponible se refiere al conjunto de grasas poliinsaturadas ingeridas: 3,9 g/día (<6 meses); 4,0 g/día (7-12 meses); 5,4 g/día (13-24 meses); 6,7 g/día (25-36 meses), (FEN & FINUT, 2015).

1.8. FUENTES ALIMENTARIAS DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES A TRAVÉS DE LA DIETA

Las fuentes actuales y principales de AGPI omega-3 incluyen: pescado y marisco, algas, krill y vegetales, así como la leche y otros productos enriquecidos con omega-3. Seguidamente, se hace una breve revisión de dichas fuentes, indicando las más importantes en el caso de España, así como posibles riesgos y beneficios, en su caso. En este sentido, conviene recordar que la publicación del Reglamento (UE) n° 116/2010, en el *Diario Oficial de la Unión Europea* el 10 de febrero de 2010, por el cual se regulan las denominaciones de alimentos como “fuente de omega-3” y “alto contenido en omega-3”, supone una oportunidad de transmitir mejor al consumidor las principales fuentes dietéticas, así como una información valiosa de especial relevancia para el etiquetado nutricional y su valor añadido. El Reglamento incluye dos premisas:

- Contenido en ácido alfa-linolénico de al menos 0,3 g por 100 g y por 100 kcal en el caso de fuente de ácidos grasos omega-3 y de 0,6 g por 100 g y por 100 kcal en el caso de alto contenido en omega-3.
- Suma de EPA y DHA de al menos 40 mg por 100 g y por 100 kcal en el caso de fuente de ácidos grasos omega-3 y de 80 mg por 100 g y por 100 kcal en el caso de alto contenido en omega-3.

Es decir, para dar la denominación “fuente de omega-3”, el alimento debe cumplir una de estas dos condiciones:

- Contenido en ácido alfa-linolénico de al menos 0,3 g por 100 g y por 100 kcal.
- Suma de EPA y DHA de al menos 40 mg por 100 g y por 100 kcal.

Para dar la denominación “alto contenido en omega-3”, el alimento debe cumplir una de estas dos condiciones:

- Contenido en ácido alfa-linolénico de al menos 0,6 g por 100 g y por 100 kcal.
- Suma de EPA y DHA de al menos 80 mg por 100 g y por 100 kcal.

1.8.1. PESCADO

En una revisión realizada por la FEN, sobre las diferentes especies de pescado y sus variadas formas de preparación y conservación existentes en el mercado alimentario español, así como el cumplimiento con las alegaciones de contenido ya mencionadas, se puede considerar como “fuente de omega-3” a todos los pescados, mariscos y

conservas, y “alto contenido en omega-3” a todos, con la excepción de las almejas, los berberechos, las chirlas, conservas de atún en aceite y conservas de almejas al natural. En caso de considerar el alimento completo, se exceptúan las almejas, los berberechos, las chirlas y las vieiras en el caso de “fuente de omega-3”, y los mejillones y las ostras en el caso de “alto contenido en omega-3” (Albert et al., 2015).

Por ello, sin duda, la fuente mayoritaria de EPA y DHA es el pescado, especialmente el de aguas frías. El pescado azul (también denominado “pescado graso”, con >5% de grasa, como el atún, salmón, sardina, caballa, jurel, anguila, anchoa o boquerón) aportan fundamentalmente EPA y DHA, mientras que el comúnmente denominado “pescado blanco” (o magro, <2% de grasa, como el bacalao, lenguado, merluza, dorada o rape) contiene EPA y DHA, pero en una cantidad significativamente inferior. Debe recordarse que no sólo hay una gran variación dependiendo del tipo de especie de pescado, sino también por la estacionalidad, dado que tendrán un contenido mucho más elevado asociado al de grasa total, siendo en nuestro país fundamentalmente en el periodo veraniego, cuando además el dicho popular dice que es “cuando están en comida”. Y es que no conviene olvidar que la grasa en su conjunto es el agente palatable de la dieta. Al igual que los mamíferos, los peces son incapaces de sintetizar EPA y DHA, y adquieren estos ácidos grasos preformados a partir del consumo de micro-algas marinas (Albert et al., 2015). La creciente preocupación ecológica por el agotamiento de los caladeros de pescado en los océanos, añadida a una contaminación en aumento del pescado por metales como el mercurio, ha hecho que se plantee el cultivo de estos organismos unicelulares, como una estrategia prometedora para garantizar el aporte de aceite rico en EPA y DHA de forma sostenible y continuada, ante el agotamiento de las reservas marinas. Por otro lado, el krill antártico (*Euphasia superba*), un pequeño crustáceo importante en la cadena trófica de los peces, contiene también cantidades notables de EPA y DHA. Se ha sugerido, por ello, que el aceite obtenido del krill, puede constituir una fuente excelente de estos ácidos grasos. Sin embargo, aspectos tan fundamentales como la biodisponibilidad y la sostenibilidad, son todavía interrogantes en el caso del krill (Schuchardt et al., 2011). Los aceites de pescado, contienen de forma natural aproximadamente un 30% de EPA+DHA, también dependiendo de la especie, origen, lugar de captura o cultivo, estacionalidad, etc. Estos aceites de pescado se suelen comercializar como suplementos o complementos alimenticios. También se presentan en el mercado los aceites concentrados de pescado,

de hasta un 90% de su contenido en forma de EPA y DHA consumidos habitualmente como cápsulas de gelatina, que entrarían de lleno en el ámbito farmacológico (Konagai et al., 2013).

1.8.2. OTRAS FUENTES ALIMENTARIAS

1.8.2.1. CEREALES Y DERIVADOS

En general, presentan un muy bajo contenido en grasa total o colesterol. En el caso de los AGPI, lo más significativo es la presencia de ácido linoleico, pero el contenido en omega-3 es muy reducido.

1.8.2.2. FRUTAS, VERDURAS Y HORTALIZAS

Presentan en general un contenido muy reducido de grasa, y sólo en el caso del boniato, batata o nabo, poseen mínimas cantidades de AGPI, fundamentalmente ácidos linoleico y linoléico. En el caso de algunas frutas, aguacate y aceituna, hay presencia de ácido oleico y linoleico.

1.8.2.3. LEGUMBRES Y FRUTOS SECOS

También tienen una muy baja cantidad de grasa y, en cualquier caso, el perfil lipídico es fundamentalmente insaturado (ácido oleico y linoleico) y sin AGPI omega-3. Los frutos secos, tienen un elevado contenido en grasa total, fundamentalmente de tipo monoinsaturado, también AGPI omega-6 en el caso de las nueces, pero sin representatividad para EPA y DHA.

1.8.2.4. HUEVOS

Como es bien conocido, la clara de huevo no contiene grasa, y es la yema la parte que aporta el contenido lipídico. Dentro de los poliinsaturados, es destacable la presencia de ácido linoleico y es insignificante el contenido en AGPI omega-3. Sin embargo, hace ya algún tiempo se han introducido en el mercado alimentario español los huevos enriquecidos en omega-3 con un perfil lipídico mayoritariamente insaturado.

1.8.2.5. CARNES Y DERIVADOS

Hay una gran heterogeneidad en este grupo, condicionada en gran medida por el contenido total de grasa (carne grasa vs carne magra), y menos por la calidad de la misma. En conjunto, este grupo no puede considerarse como fuente de AGPI omega-3.

1.8.2.6. ALIMENTOS ENRIQUECIDOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el mercado español han surgido desde hace algunos años alimentos enriquecidos en AGPI omega-3, como los ya comentados huevos, galletas, pan o la leche que es, probablemente, el más conocido y consumido. Un vaso de leche enriquecida en omega-3 proporciona aproximadamente 125 mg de EPA+DHA, lo que representa en torno al 50% de la cantidad diaria recomendada, si se toma el rango mínimo de las recomendaciones anteriormente citadas (250 mg/d), (FEN & FINUT, 2015).

1.9. COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS: LEGISLACIÓN

Nutracéutico, es un término acuñado por Stephen DeFelice que definió, como un alimento o parte de un alimento, que proporciona beneficios para la salud incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades.

El término nutracéutico, abarca una amplia categoría de productos que deben cumplir los siguientes criterios:

- Productos de origen natural
- Aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes
- Aportan beneficios para la salud:
 - Mejora de una o más funciones fisiológicas
 - Acción preventiva y/o curativa
 - Mejora de la calidad de vida
- Aportan estabilidad temporal
- Análisis de estabilidad y toxicología
- Análisis químico
- Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas
- Estudios en animales de experimentación y en humanos
- I+D según los métodos más avanzados

- Proceso de desarrollo y validación siguiendo criterios equiparables a cualquier otro medicamento (Criterios FDA)
- Aportan reproducibilidad, calidad, seguridad y eficacia

Los nutracéuticos, en definitiva, son considerados el mundo de los medicamentos de origen natural (DeFelice, 1995).

Según el Reglamento Delegado (UE) 2016/128 de la Comisión de 25 de septiembre de 2015, que complementa el Reglamento (UE) nº 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo que respecta a los requisitos específicos de composición e información aplicables a los alimentos para usos médicos especiales:

Deben estar inscritos en el Registro Sanitario de Alimentos como “Alimentos para usos médicos especiales”. Con carácter general, se entiende que se trata de fórmulas nutricionalmente completas, incluyéndose únicamente módulos en el tratamiento de situaciones metabólicas especiales.

Según la EFSA, (2017), los complementos alimenticios son fuentes concentradas de nutrientes u otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico, cuyo propósito es complementar la dieta normal. Los complementos alimenticios se comercializan en forma de dosis, por ejemplo, pastillas, tabletas, cápsulas o líquidos en dosis medidas, etc. Los complementos pueden usarse para corregir deficiencias nutricionales o mantener una ingesta adecuada de ciertos nutrientes. Sin embargo, en algunos casos, la ingesta excesiva de algunos como vitaminas y minerales, puede ser perjudicial o causar efectos secundarios no deseados, por lo tanto, los niveles máximos son necesarios para garantizar su uso seguro en los complementos alimenticios.

Según la AECOSAN, (2017), los complementos alimenticios, se definen en la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo (transpuesta a nuestro ordenamiento jurídico por el Real Decreto 1487/2009) como *“los productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir, cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias”*.

Los complementos alimenticios se deben tomar en la dosis diaria recomendada en el etiquetado del producto y no deben ser excedidas.

Los complementos alimenticios no pueden sustituir una dieta equilibrada.

Una dieta variada, rica en frutas y verduras, debe aportar todos los nutrientes necesarios.

1.10. ¿QUÉ ES LA ATENCIÓN FARMACÉUTICA?

“Los farmacéuticos deben salir de detrás de la caja registradora y empezar a servir al público, proporcionándoles cuidados, en vez de solamente fármacos. No hay futuro en el mero acto de la dispensación. Esa actividad puede hacerse, y se hará, por internet, por máquinas expendedoras y/o por técnicos entrenados para ello. El hecho que los farmacéuticos tengan una formación académica y actúen como profesionales de la salud, les ofrece la oportunidad para servir mejor de lo que lo hacen hoy en día a la sociedad” (Van Mil et al., 2004).

“La atención farmacéutica, es un concepto innovador en la práctica de farmacia, que surgió a mediados de los años setenta. Establece que todos los profesionales sanitarios deben asumir la responsabilidad de los resultados de la farmacoterapia en sus pacientes. Abarca una variedad de servicios y de funciones, algunos nuevos para la farmacia, otros tradicionales, que son determinados y proporcionados por los farmacéuticos atendiendo a los pacientes individuales. El concepto de atención, también incluye el compromiso expreso con el bienestar de los pacientes como individuos que requieren y merecen la consideración, preocupación y confianza de los farmacéuticos. Sin embargo, los farmacéuticos, a menudo no pueden aceptar la responsabilidad de esta ampliación de la atención al paciente. Consecuentemente, pueden no documentar, monitorizar y revisar adecuadamente la asistencia proporcionada. Para la práctica de la atención farmacéutica, es esencial aceptar tal responsabilidad” (Wiedenmayer et al., 2006).

Además, la atención farmacéutica es un proceso cooperativo para la provisión responsable de terapia farmacológica, a un paciente considerado individualmente. Sus objetivos son buscar, prevenir y resolver problemas relacionados con los medicamentos, para tratar de alcanzar los resultados de salud esperados y mantener o mejorar la calidad de vida del paciente (Hepler y Strand, 1990).

Durante las cuatro últimas décadas, ha habido una tendencia a cambiar la práctica del farmacéutico, de su función original de suministro de medicamentos, a una orientación hacia el cuidado del paciente. El papel del farmacéutico, ha evolucionado desde un elaborador y dispensador de fármacos hacia un proveedor de servicios y de información y, últimamente, como proveedor de cuidados de salud. En concreto, la tarea del farmacéutico consiste en asegurar que la terapia que recibe el paciente, sea la mejor indicada, la más efectiva, la más segura posible y cómoda de todas las disponibles. Asumiendo la responsabilidad directa de las necesidades farmacológicas de cada paciente, el farmacéutico puede ofrecer una contribución única a la obtención de resultados de la farmacoterapia y a la calidad de vida de sus pacientes. Este nuevo enfoque se ha dado en llamar “Atención farmacéutica”. La definición más comúnmente aceptada de este nuevo enfoque es:

“Atención farmacéutica es la provisión responsable de terapia farmacológica, con el propósito de obtener resultados precisos, que mejoren la calidad de vida del paciente” (Hepler y Strand, 1990).

Al adoptar esta definición en 1998, la FIP (Federación Internacional Farmacéutica), añadió una enmienda significativa: “obtener resultados precisos que mejoren o mantengan la calidad de vida del paciente”. La práctica de la atención farmacéutica es nueva, en contraste con lo que los farmacéuticos habían hecho durante décadas. Los farmacéuticos, a menudo no suelen asumir responsabilidades en este cuidado, ellos no lo documentan adecuadamente, ni monitorizan, ni revisan su actuación. En la práctica farmacéutica es esencial aceptar tales responsabilidades. Para poder cumplir esta obligación, el farmacéutico necesita ser capaz de asumir algunas funciones diferentes. El concepto de “Farmacéutico siete estrellas” introducido por las OMS y actualizado por la FIP en su declaración del año 2000, “Buenas prácticas de formación farmacéutica”, dibuja al farmacéutico como agente de salud, comunicador, gestor, profesor, estudiante en continua actualización, líder, director (OMS, 1997), sin olvidar el papel de investigador.

1.10.1. DESTINATARIOS

La atención farmacéutica se puede ofrecer tanto a individuos como a poblaciones:

La “**atención farmacéutica basada en la población,**” utiliza datos demográficos y epidemiológicos para establecer formularios o listados de medicamentos, desarrollar y monitorizar políticas farmacéuticas, desarrollar y gestionar redes farmacéuticas, preparar y analizar informes sobre utilización/coste de medicamentos, llevar a cabo revisiones sobre utilización de medicamentos y enseñar a los proveedores políticas sobre medicamentos y procedimientos. Sin embargo, sin “**atención farmacéutica individual**” ningún sistema puede gestionar, eficazmente, la farmacoterapia y controlar la enfermedad relacionada con medicamentos.

Las funciones basadas en la población necesitan producirse bien antes o después de visitar a los pacientes y proporcionan una información valiosa, pero no pueden sustituir a los servicios específicos para pacientes, mientras se están visitando. Las enfermedades relacionadas con medicamentos ocurren con frecuencia incluso, con medicamentos que están en un formulario o un listado, ya que estos medicamentos a menudo se prescriben, se administran o se utilizan inadecuadamente.

Los pacientes, necesitan los servicios de los farmacéuticos al tiempo que están recibiendo asistencia. La farmacoterapia adecuada es específica para cada paciente, incluye decisiones individuales, alcanzar una concordancia (un acuerdo entre el paciente y el proveedor de asistencia sanitaria, sobre el resultado terapéutico y cómo se puede alcanzar), así como actividades de monitorización del paciente crítico. Para cada tratamiento con medicamentos en un paciente individual, el farmacéutico desarrolla un plan de atención de acuerdo con el paciente. Así, los pacientes pueden contribuir al éxito de los resultados, participando en la responsabilidad de su propio cuidado y no confiando solamente en cuidadores, en un estilo paternalista de antaño.

La atención farmacéutica no existe de forma aislada respecto a otros servicios de asistencia sanitaria, por tanto, debe ofrecerse en colaboración con pacientes, médicos, enfermeros y otros proveedores de asistencia sanitaria. Los farmacéuticos son, para los pacientes, los responsables directos del coste, calidad y resultados de la atención farmacéutica.

1.10.2. PAPEL DEL FARMACÉUTICO

Las características profesionales que debe cumplir el farmacéutico son (OMS, 1997; Wiedenmayer, 2006):

1. **Cuidador:** los farmacéuticos proporcionan servicios de atención. Deben ver su práctica integrada y continua con las del sistema de asistencia sanitaria y las de otros profesionales de la salud. Los servicios deben ser de la más alta calidad.
2. **Tomador de decisiones:** el fundamento del trabajo del farmacéutico debe ser el uso apropiado, eficaz, seguro y coste-efectivo de los recursos (ej. personal, medicamentos, productos químicos, equipamiento, procedimientos, prácticas). En los niveles local y nacional, los farmacéuticos desempeñan un papel en el establecimiento de la política de los medicamentos. Para alcanzar esta meta, se requiere la capacidad de evaluar, resumir datos e información y decidir sobre la línea de acción más apropiada.
3. **Comunicador:** el farmacéutico está en una posición ideal para proporcionar una unión entre el prescriptor y el paciente, y para comunicar información sobre salud y medicamentos al público. Él o ella deben estar bien informados y seguros, mientras interactúan con otros profesionales de la salud y el público. La comunicación implica habilidades verbales, no verbales, de escucha y de escritura.
4. **Gestor:** los farmacéuticos deben poder gestionar con eficacia los recursos (humanos, físicos, financieros) y la información. También deben sentirse cómodos dirigidos por otros, ya sea por un patrón o el director/líder del equipo de salud. Además, la información y su tecnología relacionada proporcionarán desafíos, según los farmacéuticos vayan asumiendo una mayor responsabilidad en compartir información sobre medicamentos y productos relacionados, así como asegurar su calidad.
5. **Estudiante permanente:** es imposible adquirir en los estudios de farmacia todo el conocimiento y la experiencia necesaria para continuar la carrera de farmacéutico durante toda la vida. Los conceptos, principios y obligaciones de la formación continuada, deben comenzar mientras se está estudiando farmacia y deben mantenerse a lo largo de la carrera del farmacéutico. Los farmacéuticos deben aprender cómo mantener actualizados sus conocimientos y habilidades.
6. **Profesor:** el farmacéutico tiene la responsabilidad de ayudar en la formación y entrenamiento de las generaciones futuras de farmacéuticos y del público. Participando como profesor, no sólo imparte conocimiento a otros, sino que

ofrece una oportunidad para que los profesionales sanitarios adquieran nuevos conocimientos y mejoren sus habilidades actuales.

7. **Líder:** en situaciones de atención multidisciplinaria (ej. equipo de salud) o en áreas donde otros proveedores de asistencia sanitaria escasean o no existan, obligan al farmacéutico a asumir una posición de liderazgo en el bienestar total del paciente y de la comunidad. El liderazgo implica la preocupación y la empatía, así como la visión y la capacidad de tomar decisiones, comunicarlas y manejarlas con eficacia. Un farmacéutico cuyo papel de liderazgo sea reconocido, debe tener la visión y la capacidad de orientar.
8. **Investigador:** el farmacéutico debe poder utilizar la base de la evidencia (ej. científica, práctica farmacéutica, sistema de la salud) con eficacia, para aconsejar sobre el uso racional de medicamentos en el equipo de salud. Compartiendo y documentando experiencia, el farmacéutico puede también contribuir a la base de la evidencia con el objetivo de optimizar el cuidado de los pacientes y los resultados. Como investigador, el farmacéutico puede aumentar la accesibilidad a una salud ecuánime y a la información sobre medicamentos, tanto al público como a otros profesionales de la asistencia sanitaria, así como promover el respaldo institucional y político, alianzas estratégicas con otras organizaciones, asociaciones, sociedades científicas y Universidades, para favorecer el desarrollo de estas líneas de trabajo (Declaración de Córdoba, 2014).

1.10.3. UN NUEVO RETO: PUESTA EN MARCHA DESDE LA OFICINA DE FARMACIA

La Oficina de Farmacia debe buscar nuevas vías que mejoren y enriquezcan el ámbito de actuación. Para ello, es importante que las administraciones públicas apoyen acciones estratégicas que permitan:

- Incrementar la participación de las farmacias en iniciativas de Salud Pública: educación sanitaria, prevención de la enfermedad y promoción de la salud.
- Impulsar iniciativas que favorezcan la colaboración de las Oficinas de Farmacia con el resto de profesionales sanitarios implicados en la atención al paciente.

En este contexto, la Oficina de Farmacia puede incorporar nuevos servicios asistenciales que complementen la labor de consejo y dispensación llevada a cabo con

los pacientes y usuarios. De esta forma, las Oficinas de Farmacia han incrementado su oferta cara al público con propuestas originales que han mejorado sin lugar a dudas la calidad asistencial, entre las que cabe mencionar:

- Servicios especializados en nutrición y dietética para los usuarios, en los que se realiza un control individualizado de la ingesta correcta de nutrientes y de los hábitos nutricionales.
- Venta y consejo sobre cosméticos, introduciendo nuevas líneas de productos sobre una base sanitaria que sólo el profesional de la Farmacia conoce.
- Incorporaciones en la propia Oficina de Farmacia de servicios de guardería y gimnasio, que permiten una mejor adaptación a los problemas actuales de la sociedad, ofreciendo alternativas útiles y novedosas a los usuarios.

Todos estos aspectos inciden sobre el papel fundamental que juega la Oficina de Farmacia en la Sanidad Pública, pero existen muchos campos de participación en los que la Oficina de Farmacia podría desarrollar interesantes e importantes aportaciones.

Esta tesis es, precisamente, un fiel reflejo y puesta en marcha del ámbito de actuación y ejecución de la interacción llevada a cabo desde la Universidad Miguel Hernández de Elche en consonancia con la Oficina de Farmacia sita en C/ Doctor Caro 101 de Elche, y regentada por la Lcda. Doña Asunción Iborra Campos, quien nos ha permitido llevar a cabo en sus instalaciones la parte de intervención nutricional descrita en capítulos posteriores.

De este modo, la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha sido pionera en explorar la posibilidad desde la propia Oficina de Farmacia, concretamente en el ámbito de la nutrición, como un agente activo en la participación en proyectos de investigación, llevando a cabo el desarrollo de dos estudios de intervención nutricional, así como las pruebas diagnósticas y de autocontrol a través de la determinación de indicadores biológicos a partir de la técnica de química seca:

- En el primer estudio, se realizó una intervención nutricional con complementos alimenticios omega-3, concretamente cápsulas omega-3 y determinación de indicadores biológicos.
- En el segundo estudio, la intervención se realizó con semilla de lino, como fuente natural de ácidos grasos omega-3 y determinación de indicadores biológicos.

La tendencia a nivel nacional, sería extrapolar este tipo de iniciativas y avalarlo por el convenio marco de colaboración, firmado entre los Colegios de Farmacia y el Ministerio de Sanidad.

- Desarrollar las necesidades formativas, de ordenación farmacéutica, atención sociosanitaria e investigación evaluativa.
- Definir a la red de Oficinas de Farmacia como un modelo de eficiencia en la colaboración entre centros sanitarios y asistenciales públicos y privados.
- Establecer cooperaciones de tipo interprofesional e interniveles asistenciales en las que el farmacéutico jugaría un papel de agente activo fundamental.

Se trataría, por tanto, de una nueva perspectiva de actuación dentro de la Oficina de Farmacia, que en la actualidad ha sido muy poco explorada.

1.11. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA LLEVAR A CABO PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL EN EL ÁMBITO DE LA OFICINA DE FARMACIA

El protocolo de actuación incluye cuatro fases destacadas:

1.11.1. INICIACIÓN

La iniciación implica que exista una idea de partida, que permita llevar a cabo el desarrollo de un proyecto determinado. La idea puede partir bien de la propia Universidad o de cualquier centro de investigación que esté dispuesto a desarrollar un proyecto en el ámbito de la Oficina de Farmacia. Por otro lado, la idea también puede proceder de una empresa del sector farmacéutico o de la alimentación que, en colaboración con la Universidad y la Oficina de Farmacia, estén dispuestos a desarrollar el proyecto en común.

Los estudios llevados a cabo para el desarrollo de esta tesis han consistido en:

- Detección precoz de indicadores biológicos relacionados con ECV a partir de sangre capilar, mediante la tecnología de química seca, control de hábitos nutricionales e intervención nutricional durante un mes, con ácidos grasos omega-3 procedentes de distintas fuentes:
 - Cápsulas omega-3

- Semilla de lino entera

Para ello se llevó a cabo la elaboración de una serie de documentos y trámites necesarios para el posterior desarrollo del proyecto.

1.11.2. DOCUMENTACIÓN

- **Convenio entre la Universidad y la Oficina de Farmacia:** se establece un marco de actuación legal, así como las pautas por las que la Universidad y la Oficina de Farmacia van a interactuar. Dicho convenio tiene una alta relevancia, ya que la Oficina de Farmacia es el contacto directo con el cliente-usuario-paciente y la atención farmacéutica va a ser el pilar fundamental para el desarrollo y ejecución del proyecto. Las instalaciones de la Oficina de Farmacia serán el escenario para llevar a cabo la ejecución del proyecto y donde tendrá lugar la toma de datos para la captación del cliente-usuario-paciente, así como la toma de muestras.
- **Comité de Ética:** es el órgano evaluador del proyecto y, por tanto, será el encargado de aprobar siempre que lo estime oportuno la propuesta del proyecto planteado bien desde la Universidad, o bien desde el Centro de Investigación Público o Empresa. Mediante la documentación correspondiente y los distintos formularios aportados. El Comité de ética será conocedor de los distintos apartados en los que el proyecto se constituye:
 - **Introducción al proyecto:** justificación y descripción del estudio a desarrollar.
 - **Fuente de financiación:** puede ser de origen público o privado.
 - **Lugar de realización:** tendrá lugar en las instalaciones de la Oficina de Farmacia, aunque ciertas determinaciones y el procesamiento de datos se podrán llevar a cabo en las instalaciones de la Universidad, Centro de Investigación o Empresa.
 - **Personal que intervienen en el proyecto:** el propio de la Oficina de Farmacia, los investigadores participantes desde la Universidad y otros cargos dependiendo de la entidad e institución colaboradora.
 - **Objetivos:** se describirán en el proyecto los objetivos que pretenden alcanzarse con la ejecución del mismo.

- **Metodología:** se describirán las técnicas, procedimientos, metodología, determinaciones y equipos a utilizar.
- **Justificación del estudio:** se describirá el tipo de estudio que se llevará a cabo, así como los criterios de inclusión y exclusión, rango de edades, datos que se van a proporcionar y codificación de los datos de los participantes.
- **Legislación:** para verificar que el proyecto se acoge a la normativa legal establecida, se referenciará la legislación vigente.

Junto con la documentación que debe remitirse al Comité de Ética, es necesario que las instalaciones en las que se van a realizar las determinaciones adicionales, como los laboratorios de la Universidad, se acojan a la normativa de riesgos laborales, tanto en materia química, como biológica. El documento que certifique el cumplimiento de dicha normativa debe ser remitido igualmente al Comité de Ética. Además, es necesario elaborar un documento de consentimiento informado que deberá dirigirse a cada uno de los participantes en el estudio y ser aprobado igualmente por el Comité de Ética. Dicho documento contemplará una serie de apartados e informará de forma sencilla y entendible a cada sujeto. Los apartados de los que constan son:

- **Identificación, descripción y objetivos del procedimiento:** breve explicación del estudio en el que el sujeto va a participar.
- **Beneficios que se esperan alcanzar:** se describe si la participación en el estudio es remunerada o gratuita, así como cualquier otro tipo de beneficio indirecto, consecuencia de la participación en el propio estudio.
- **Alternativas razonables:** se describe que la participación es voluntaria y que no conlleva ningún tipo de compromiso al participante, que no está obligado a nada y que puede abandonar el estudio sin previo aviso y sin ofrecer ningún tipo de explicación.
- **Consecuencias previsibles de la realización o no realización de la participación en el proyecto:** cada participante decide ser informado o no de los resultados del estudio, una vez finalizado el mismo.
- **Riesgos:** se describen los posibles riesgos que tiene el procedimiento experimental aplicado para la obtención de muestras, si ese fuera el caso.
- **Protección de datos personales y confidencialidad:** en este apartado se especifica al participante que se va a respetar la legislación vigente y que

sus datos personales se van a codificar para que en ningún momento de la investigación el sujeto pueda ser identificado como tal.

- **Firmas:** siempre que el participante esté de acuerdo deberá firmar el consentimiento informado. Es importante contar con la firma de un testigo, normalmente un familiar o una persona cercana, que avale que la información proporcionada verbalmente figura y consta en el documento que se está firmando. Igualmente, la firma del investigador principal debe figurar, así como la fecha.
- **Documento de renuncia o abandono:** en el momento de la firma se les proporcionará un documento de renuncia o abandono, para que el sujeto participante pueda ejercer su derecho de no continuar con la investigación, sin dar explicaciones de ningún tipo.

Si, además de la Universidad y la Oficina de Farmacia, participa una empresa del sector farmacéutico o alimentario, se firmará un convenio de colaboración Universidad-Empresa. El documento se adaptará a las particularidades de la investigación que se vaya a desarrollar y contemplará una serie de datos tales como:

- **Identificación de las partes:** se incluye el nombre y los datos fiscales de la empresa, su representante legal y toda la información que permita la correcta identificación de la misma.
- **Objeto del contrato:** se describe, brevemente, la finalidad del proyecto a desarrollar entre la Universidad y la empresa.
- **Aceptación del trabajo:** incluye la conformidad de ambas partes al realizar el proyecto.
- **Duración y lugar de realización del proyecto:** se indica el tiempo previsto para realizar el proyecto, así como el lugar donde se llevará a cabo el mismo, indicando la parte a desarrollar en la Oficina de Farmacia.
- **Emisión de informes:** en este punto, se hace referencia a los documentos que informan sobre la marcha y los resultados obtenidos. La periodicidad de los informes se establecerá de antemano, aunque no es un requisito obligatorio. El informe final será emitido por parte de la Universidad.

- **Confidencialidad:** se establece que la empresa contratante será la única informada por parte de la Universidad. La difusión en foros científicos (congresos, conferencias, publicaciones científicas, patentes, etc.) también quedará registrada en este apartado. La utilización de los logos y el nombre de la Universidad quedarán recogidos en este apartado.
- **Importe y condiciones de pago:** se describen los aspectos relativos a la financiación del proyecto, cuantía y forma de pago del mismo, mediante un presupuesto detallado adjunto. También se indica el porcentaje destinado al IVA y a los costes indirectos que repercuten en la Universidad.
- **Modificación y resolución del contrato:** el desarrollo del proyecto, puede verse modificado por imprevistos que deberán detallarse en este apartado.
- **Notificaciones:** se establecen direcciones y contactos para el desarrollo del proyecto.
- **Normativa:** se hará alusión a la legislación vigente.
- **Anexo:** deberá incluir una descripción detallada del proyecto.

Finalmente, en esta fase es importante poder inscribir el proyecto en una base de datos de estudios clínicos, si así fuera necesario. Estas bases permiten registrar el estudio de forma oficial, quedando a disposición para la comunidad científica. Este registro se realiza normalmente on-line y existen varias organizaciones que, previo pago o de forma gratuita, permiten dicho registro. Lo más aconsejable es utilizar las webs que proporcionan la Plataforma de Registros Internacionales de la Organización Mundial de la Salud:

- <https://clinicaltrials.gov>
- www.ISRCTN.org
- www.actr.org.au
- www.umin.ac.jp
- www.trialregister.nl

Cada organización solicita una serie de datos que deben ser consignados en los diferentes apartados. Un Comité evalúa el diseño del estudio y la calidad de la información proporcionada y en, caso necesario, solicita información adicional a los

investigadores. Al final del proceso, proporcionan un número de registro con el que el estudio ha quedado oficialmente inscrito en las bases de datos internacionales. De esta forma el estudio puede ser consultado por otros grupos de investigación, por equipos clínicos e incluso por pacientes. “ClinicalTrials.gov” es la mayor base de datos gratuita a nivel mundial para estudios clínicos y donde se puede recabar la mayor información.

Los estudios registrados pueden responder a numerosos diseños experimentales, aunque a nivel de Oficina de Farmacia se van a desarrollar dos grandes tipos de estudios: estudios de intervención y estudios observacionales. En los primeros, los participantes se someterán a un protocolo de actuación, por ejemplo, seguir una dieta, ingerir un complemento alimenticio, etc. En los segundos, los participantes continúan su rutina y sus hábitos, tan sólo proporcionan al equipo de investigación la información requerida por éstos.

1.11.3. ACTUACIÓN

La fase de actuación corresponde íntegramente a la ejecución del estudio. Comienza con un reclutamiento de los participantes candidatos para el estudio. Para ello, se establecen los criterios de inclusión y exclusión. Los participantes que cumplan con los criterios de inclusión, proporcionarán una serie de datos personales (nombre, edad, etc.), datos antropométricos (peso, talla, etc.), recordatorios dietéticos de 24 horas, historial de medicamentos, entre otros. En cualquier caso, en esta fase se establecerá el protocolo para respetar el anonimato de los participantes según lo aprobado por el Comité de Ética y el participante firmará dos copias del consentimiento informado, una para él mismo y la otra para el investigador.

Llegados a este punto, se desarrolla la intervención u observación según el protocolo establecido para la investigación. Cada una de las partes tendrá asignadas una serie de tareas de acuerdo al desarrollo del proyecto. Así, la Oficina de Farmacia podrá distribuir encuestas y recogerlas. También, podrá hacer las determinaciones con los equipos disponibles en la propia Oficina de Farmacia, tales como el Reflotrón Plus (analizador de química seca) que permiten determinar sobre una gota de sangre los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-colesterol, transaminasas, entre otros.

Otras determinaciones podrán realizarse con la báscula y el tallímetro para determinar el peso y la altura del participante, así como la tensión arterial con el tensiómetro. Igualmente, la Oficina de Farmacia podrá recoger todo tipo de datos

clínicos proporcionados por el participante y que haya podido realizar fuera de la Oficina de Farmacia, como analíticas completas, electrocardiogramas, radiografías etc., siempre que sean relevantes y necesarios para el desarrollo de la investigación.

Los investigadores de la Universidad podrán realizar determinaciones complementarias sobre las muestras proporcionadas por el participante, siempre bajo su consentimiento, con el objetivo de complementar la investigación.

Finalmente, la Universidad procederá al procesamiento de datos y al tratamiento estadístico correspondiente, manteniendo el anonimato de los participantes en todo momento.

1.11.4. FINALIZACIÓN

En la fase final, es donde tendrá lugar el análisis y la valoración de los resultados obtenidos. Existen diversos paquetes informáticos que permiten el tratamiento estadístico de los mismos, siendo el más utilizado el SPSS (Statistical Package for Social Sciences). Existen otros paquetes estadísticos para tratamientos más complejos.

En esta fase se debe cumplir con el objetivo de informar a las distintas partes. Para ello, lo más recomendable es culminar con la confección de una publicación disponible para toda la comunidad científica. Básicamente, existen numerosas revistas científicas que pueden admitir los resultados para su publicación, tras concienzudo trabajo de revisión por parte de evaluadores anónimos que elige la editorial. Cada revista tiene una normativa particular pero, básicamente, una publicación científica suele tener una serie de apartados fijos, como son:

- Resumen
- Introducción
- Material y Métodos
- Resultados
- Discusión
- Bibliografía

Es importante destacar si existe conflicto de intereses, sobre todo en aquellos estudios que hayan sido financiados por una empresa privada.

La redacción de los artículos para publicar, deberá ajustarse a diferentes criterios, dependiendo si el estudio es de tipo observacional o de intervención. Para ello,

existe una normativa que es conveniente seguir en ambos casos. Para los estudios de intervención se sigue la normativa CONSORT, mientras que para los estudios de observación se sigue la normativa STROBE. La idea de estas normativas es que la publicación refleje con total exactitud y transparencia, el procedimiento empleado y los resultados obtenidos. Para ello, existen unas listas de comprobación en las que se recogen los diferentes apartados que deben ser considerados y en qué parte de la publicación debe figurar dicha información. Las listas de comprobación para CONSORT y STROBE se muestran a continuación:



Tabla 7. Lista de comprobación CONSORT

Sección/tema	Ítem n°	Ítem de la lista de comprobación
Título y resumen		
	1a	Identificado como un ensayo aleatorizado en el título
	1b	Resumen estructurado del diseño, métodos, resultados y conclusiones del ensayo (para una orientación específica, véase “CONSORT for abstracts”)
Introducción		
	2a	Antecedentes científicos y justificación
	2b	Objetivos específicos o hipótesis
Métodos		
Diseño del ensayo	3a	Descripción del diseño del ensayo (p.ej., paralelo, factorial), incluida la razón de asignación
	3b	Cambios importantes en los métodos después de iniciar el ensayo (p. ej., criterios de selección) y su justificación
Participantes	4a	Criterios de selección de los participantes
	4b	Procedencia (centros e instituciones) en que se registraron los datos
Intervenciones	5	Las intervenciones para cada grupo, con detalles suficientes para permitir la replicación, incluidos cómo y cuándo se administraron realmente

Resultados	6a	Especificación a priori de las variables respuesta (o desenlace) principal(es) y secundarias, incluidos cómo y cuándo se evaluaron
	6b	Cualquier cambio en las variables respuesta tras el inicio del ensayo, junto con los motivos de la(s) modificación(es)
Tamaño muestral	7a	Cómo se determinó el tamaño muestral
	7b	Si corresponde, explicar cualquier análisis intermedio y las reglas de interrupción
Aleatorización:		
Generación de la secuencia	8a	Método utilizado para generar la secuencia de asignación aleatoria
	8b	Tipo de aleatorización; detalles de cualquier restricción (como bloques y tamaño de los bloques)
Mecanismo de ocultación de la asignación	9	Mecanismo utilizado para implementar la secuencia de asignación aleatoria (como contenedores numerados de modo secuencial), describiendo los pasos realizados para ocultar la secuencia hasta que se asignaron las intervenciones
Implementación	10	Quién generó la secuencia de asignación aleatoria, quién seleccionó a los participantes y quién asignó los participantes a las intervenciones
Enmascaramiento	11a	Si se realizó, a quién se mantuvo cegado después de asignar las intervenciones (p. ej., participantes, cuidadores, evaluadores del resultado) y de qué modo
	11b	Si es relevante, descripción de la similitud de las intervenciones
Métodos estadísticos	12a	Métodos estadísticos utilizados para comparar los grupos en cuanto a la variable respuesta principal y las secundarias
	12b	Métodos de análisis adicionales, como análisis de subgrupos y análisis ajustados

Resultados

Flujo de participantes (se recomienda encarecidamente un diagrama de flujo)	13a	Para cada grupo, el número de participantes que se asignaron aleatoriamente, que recibieron el tratamiento propuesto y que se incluyeron en el análisis principal
	13b	Para cada grupo, pérdidas y exclusiones después de la aleatorización, junto con los motivos
Reclutamiento	14a	Fechas que definen los períodos de reclutamiento y de seguimiento
	14b	Causa de la finalización o de la interrupción del ensayo
Datos basales	15	Una tabla que muestre las características basales demográficas y clínicas para cada grupo
Números analizados	16	Para cada grupo, número de participantes (denominador) incluidos en cada análisis y si el análisis se basó en los grupos inicialmente asignados
Resultados y estimación	17a	Para cada respuesta o resultado final principal y secundario, los resultados para cada grupo, el tamaño del efecto estimado y su precisión (como intervalo de confianza del 95%)
	17b	Para las respuestas dicotómicas, se recomienda la presentación de los tamaños del efecto tanto absoluto como relativo
Análisis secundarios	18	Resultados de cualquier otro análisis realizado, incluido el análisis de subgrupos y los análisis ajustados, diferenciados entre los especificados a priori y los exploratorios

Daños (Perjuicios)	19	Todos los daños (perjuicios) o efectos no intencionados en cada grupo (para una orientación específica, véase “CONSORT for harms”
Discusión		
Limitaciones	20	Limitaciones del estudio, abordando las fuentes de posibles sesgos, las de imprecisión y, si procede, la multiplicidad de análisis
Generalización	21	Posibilidad de generalización (validez externa, aplicabilidad) de los hallazgos del ensayo
Interpretación	22	Interpretación consistente con los resultados, con balance de beneficios y daños, y considerando otras evidencias relevantes
Otra información		
Registro	23	Número de registro y nombre del registro de ensayos
Protocolo	24	Dónde puede accederse al protocolo completo del ensayo, si está disponible
Financiación	25	Fuentes de financiación y otras ayudas (como suministro de medicamentos), papel de los financiadores

*(Cobos-Carbó y Augustovski, 2010) *Recomendamos de modo encarecido leer esta lista de comprobación junto con “the CONSORT 2010*

Explanation and Elaboration” para aclarar dudas importantes sobre todos los ítems. Si procede, también recomendamos leer las extensiones de CONSORT para ensayos aleatorizados por conglomerados, ensayos de no-inferioridad y equivalencia, tratamientos no farmacológicos, intervenciones de medicamentos herbales y ensayos pragmáticos. Se están preparando otras extensiones: para estas y para referencias actualizadas relevantes relacionadas con esta lista de verificación; véase www.consort-statement.org

Tabla 8. Lista de comprobación STROBE: ESTUDIOS OBSERVACIONALES

Título y resumen	PUNTO	RECOMENDACIÓN
	1	<p>(a) Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio con un término habitual</p> <p>(b) Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado</p>
Introducción Contexto/fundamentos	2	Explique las razones y el fundamento científico de la investigación que se comunica
Objetivos	3	Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada
Métodos Diseño del estudio	4	Presente al principio del documento los elementos clave del diseño del estudio
Contexto	5	Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluido los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos
Participantes	6	(a) Estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento

Estudios de casos y controles: proporcione los criterios de elegibilidad así como las fuentes y el proceso diagnóstico

de los casos y el de selección de los controles. Proporcione las razones para la elección de casos y controles

Estudios transversales: proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes

(b) Estudios de cohortes: en los estudios apareados, proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición

Estudios de casos y controles: en los estudios apareados, proporcione los criterios para la formación de las parejas y el número de controles por cada caso

Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos

Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida)

Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida

Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo

Explique cómo se determinó el tamaño muestral

Variables

7

Fuentes de datos/medidas

8*

Sesgos

9

Tamaño muestral

10



VARIABLES CUANTITATIVAS	11	Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique qué grupos se definieron y por qué
MÉTODOS ESTADÍSTICOS	12	<p>(a) Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión</p> <p>(b) Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones</p> <p>(c) Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data)</p> <p>(d) Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento</p> <p>Estudios de casos y controles: si procede, explique cómo se aparearon casos y controles</p> <p>Estudios transversales: si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo</p> <p>(e) Describa los análisis de sensibilidad</p>
RESULTADOS PARTICIPANTES	13*	<p>(a) Describa el número de participantes en cada fase del estudio; por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento completo y los analizados</p> <p>(b) Describa las razones de la pérdida de participantes en cada fase</p> <p>(c) Considere el uso de un diagrama de flujo</p>



Datos descriptivos

14*

- (a) Describa las características de los participantes en el estudio (p.ej., demográficas, clínicas, sociales) y la información sobre las exposiciones y los posibles factores de confusión
- (b) Indique el número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés
- (c) Estudios de cohortes: resume el período de seguimiento (p.ej., promedio y total)

Datos de las variables de resultado

15*

Estudios de cohortes: describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo

Estudios de casos y controles: describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporcione medidas resumen de exposición

Estudios transversales: describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen



Resultados principales	16	(a) Proporcione estimaciones no ajustadas y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p.ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos
		(b) Si categoriza variables continuas, describa los límites de los intervalos
		(c) Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante
Otros análisis	17	Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad)
Discusión		
Resultados clave	18	Resume los resultados principales de los objetivos del estudio
Limitaciones	19	Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo
Interpretación	20	Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes

Generabilidad	21	Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa)
Otra información: financiación	22	Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente artículo

(Von Elm et al., 2007) Se ha publicado un artículo que explica y detalla la elaboración de cada punto de la lista, y se ofrece el contexto metodológico y ejemplos reales de comunicación transparente 18-20. La lista de puntos STROBE se debe utilizar preferiblemente junto con ese artículo (gratuito en las páginas web de las revistas PLoS Medicine [<http://www.plosmedicine.org/>], *Annals of Internal Medicine* [<http://www.annals.org/>] y *Epidemiology* [<http://www.epidem.com/>]). En la página web de STROBE (<http://www.strobe-statement.org>) aparecen las diferentes versiones de la lista correspondiente a los estudios de cohortes, a los estudios de casos y controles y a los estudios transversales. *Proporcione esta información por separado para casos y controles en los estudios con diseño de casos y controles. Si procede, también de los grupos con y sin exposición en los estudios de cohortes y en los transversales

UNIVERSITAS
Liguel
ernández

Si en el estudio ha participado una empresa, se deberá proceder a confeccionar, al menos, un informe final donde figuren los resultados obtenidos y una interpretación de los mismos, lo más objetiva posible. También es importante, si así lo han manifestado, la información a los participantes. La fórmula empleada en estos casos podrá ser un poco más informal, pero no exenta de rigor. Dependiendo de los casos, se podrá elaborar un informe divulgativo que se podrá entregar al participante impreso en papel o en formato electrónico. En algunos casos, el participante preferirá recibir la información verbal en la propia Oficina de Farmacia o por llamada telefónica.

En cualquier caso, si el estudio llega a publicarse o publicitarse en los medios de comunicación, es conveniente dejar la información aparecida a disposición de los participantes en la propia Oficina de Farmacia.

1.11.5. RESULTADOS

Este protocolo ha sido aplicado con éxito en dos estudios. En ellos participó la Oficina de Farmacia sita en Elche, regentada por la Licenciada en Farmacia Doña María Asunción Iborra Campos.

1.11.6. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

En el primer estudio, se llevó a cabo la determinación del grado de oxidación que presentaban diversas marcas comerciales de cápsulas conteniendo ácidos grasos omega-3 y que se dispensaban habitualmente en Oficina de Farmacia. Se hizo un estudio de intervención nutricional en usuarias habituales de dicha Oficina de Farmacia, de cápsulas más oxidadas frente a las menos oxidadas, con el fin de determinar la acción de las mismas en el perfil lipídico de las participantes, durante un mes.

1.11.7. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLA DE LINO ENTERA

En el segundo estudio, se llevó a cabo la extracción del aceite de la semilla de lino mediante la técnica soxhlet y ultrasonidos, determinación de la estabilidad oxidativa mediante rancimat, y caracterización de ácidos grasos mediante gases masas. Se hizo un estudio de intervención nutricional sobre usuarias habituales de la Oficina de Farmacia con semilla de lino entera, con el fin de determinar la acción de las mismas en el perfil lipídico de las participantes, durante un mes.

1.11.8. DISCUSIÓN

El protocolo de trabajo presentado se desarrolla en dos dimensiones clave para la Oficina de Farmacia: el cliente-usuario-paciente de la Oficina de Farmacia y la participación activa de la Oficina de Farmacia en el Sistema Nacional de Salud desde una nueva perspectiva. Desde el punto de vista del cliente-usuario-paciente, supone mostrar una nueva dimensión al mismo, en la que toma un papel más activo y participativo.

Desde la perspectiva de la Oficina de Farmacia se abre un amplio abanico de aspectos a considerar:

- Información y educación sanitaria al cliente-usuario-paciente desde una perspectiva de participación e implicación por parte de éste.
- El farmacéutico es un agente activo en la investigación y generación de conocimiento desde su propia Oficina de Farmacia, discutiendo los protocolos, participando en su desarrollo y analizando los resultados.
- Abre un nuevo tipo de interacción con las empresas del sector, que pasan de ser meras suministradoras de productos a agentes participantes en el proceso de investigación y generación de conocimiento.
- Por todo ello, se fomenta el espíritu emprendedor y colaborativo, enriqueciendo la oferta de la propia Oficina de Farmacia de cara al usuario, que en muchos casos, puede repercutir en una mejor imagen de la propia Oficina de Farmacia y en un incremento de las ventas.

Este protocolo de actuación, es el germen del desarrollo de nuevos proyectos e ideas, en las que las Oficinas de Farmacias se conviertan en un agente activo del Sistema Nacional de Salud. Aquí se abre la puerta a todo tipo de estudios, además de los de tipo nutricional ya mencionados, como estudios farmacológicos, psicológicos, sociológicos, etc. La coordinación desde los Colegios Farmacéuticos territoriales, puede permitir la realización de estudios epidemiológicos en amplios segmentos de la población. Por todo ello, se trata de una nueva forma de participación de la Oficina de Farmacia que presenta amplias perspectivas de futuro.

OBJETIVOS



El trabajo realizado en la presente tesis doctoral se sustenta sobre 3 premisas preliminares:

- Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte a nivel mundial. En España, según los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística, las principales causas de muerte por grupos de enfermedades son las del sistema circulatorio.
- Modificar los hábitos alimentarios con la inclusión de una dieta rica en pescado más una fuente de omega-3, es una de las estrategias dietéticas para tratar a mujeres adultas usuarias de Oficina de Farmacia, con niveles de colesterol y triglicéridos cercanos a límites no saludables, aunque puede resultar difícil ya que es necesario establecer cambios en los hábitos alimentarios y estilo de vida.
- Otro aspecto relevante, es la calidad de los aceites encapsulados, ya que al tratarse de ácidos grasos muy insaturados presentan alta susceptibilidad a la oxidación, sin tener conocimiento de cómo el diferente grado de oxidación con el que llegan al consumidor, puede repercutir en el efecto hipolipémico.

Este trabajo, se centra en el estudio del efecto de la dieta hipocolesterolemia rica en pescado más una fuente de omega-3 administrada de diferentes formas; como complemento alimenticio y como fuente natural. Se pretende estudiar si estas intervenciones pueden mejorar el perfil lipídico sobre la base de la hipótesis siguiente: las mujeres dislipémicas al ser alimentadas con una dieta rica en pescado más una fuente de omega-3 ¿podrían normalizar sus parámetros lipémicos circulantes, evidenciados por los cambios bioquímicos en sus analíticas sanguíneas?

Para ello se han planteado los siguientes objetivos:

2. OBJETIVOS

Los objetivos concretos de esta tesis son los siguientes:

2.1. OBJETIVO METODOLÓGICO

- Elaboración de un protocolo de actuación farmacéutica, como herramienta que permita al farmacéutico y a sus auxiliares, proteger y mejorar la salud de sus

clientes-usuarias-pacientes y establecer los procedimientos para su posterior aplicación.

2.2. OBJETIVOS BROMATOLÓGICOS

- Determinar el grado de alteración oxidativa de diferentes marcas comerciales de cápsulas de aceite de pescado omega-3, dispensadas en Oficinas de Farmacia, parafarmacias y grandes establecimientos.
- Evaluar diferentes técnicas utilizadas en la extracción de aceite y estabilidad oxidativa, de diferentes marcas comerciales de semilla de lino, dispensadas en herboristerías y grandes establecimientos.

2.3. OBJETIVOS NUTRICIONALES

- Promocionar la salud del cliente-usuaria-paciente, con el uso de diferentes herramientas nutricionales a través de la actuación en Oficina de Farmacia.
- Determinar el efecto de diferentes fuentes de omega-3 sobre parámetros bioquímicos circulantes, en clientes-usuarias-pacientes de Oficina de Farmacia adultas con niveles de colesterol y triglicéridos cercanos al límite, no saludable. Estimación de un posible efecto hipolipémico.

MATERIALES
Y MÉTODOS



CONCLUSIONES

3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD: OXIDACIÓN DEL ACEITE OMEGA-3 ADMINISTRADO EN FORMA DE CÁPSULAS

3.1. TOMA Y ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron 16 marcas comerciales de aceite de pescado omega-3, realizando un barrido en Oficinas de Farmacia y en establecimientos destinados a su venta, parafarmacias, tiendas dietéticas y grandes superficies, distribuidas por toda la ciudad de Elche (Alicante). En el presente estudio se ha considerado oportuno clasificar las muestras en función del grado de oxidación de las mismas.

Una vez en el laboratorio, las muestras se conservaron, protegidas de la luz y de la humedad, y se mantuvieron a temperatura ambiente, imitando las condiciones de almacenamiento comerciales durante 6 meses, hasta la realización de las distintas determinaciones. Los parámetros de oxidación se realizaron por triplicado, al inicio y después de cada mes de almacenamiento. Para la determinación de los parámetros de calidad se han aplicado los métodos oficiales de análisis recogidos en el Reglamento (CEE) 2.568/1991 relativo a las características de los aceites de oliva y posteriores modificaciones (Reglamentos (CE) 796/2002 y 1989/2003).

3.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS: ACEITE DE PESCADO OMEGA-3

PRINCIPIO:

Se denomina “índice de peróxidos” a los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en 1Kg de grasa, calculados a partir del yodo liberado del yoduro potásico.

Las grasas, al igual que otras muchas sustancias no saturadas, sufren oxidación espontánea por el oxígeno atmosférico. El resultado de una prolongada oxidación de las grasas es el desarrollo de un enranciamiento, acompañado de una pérdida de calidad y del comienzo de sabores no deseables. Aunque el deterioro de las grasas puede provenir de otras causas distintas a la oxidación, tal como la acción de enzimas o microorganismos, la oxidación es, como mucho, la causa más importante desde un punto de vista práctico. La luz, el calor y ciertas impurezas, tales como el agua y los metales, aceleran esta reacción.

El enranciamiento o autooxidación, es una alteración de gran importancia comercial por las pérdidas que produce en los aceites. La acción del oxígeno atmosférico sobre las cadenas alifáticas de ácidos grasos y glicéridos da lugar al sabor y olor típicos, fuertes y desagradables, y a la formación de compuestos nocivos.

Durante las primeras fases de la oxidación de una grasa, se dan pequeños e imperceptibles cambios en la composición, sabor u olor, mientras que aparece un lento pero gradual, aumento en la concentración de peróxidos. Este periodo se denomina, con frecuencia, periodo de inducción o iniciación, cuya duración está relacionada con la resistencia de la grasa a la oxidación. El segundo periodo, sigue directamente al primero y representa un estado en el que tiene lugar rápidamente la oxidación propiamente dicha, se desarrolla enranciamiento, olores y sabores asociados con él. El contenido de peróxidos aumenta en proporción acelerada (reacción en cadena). Cuando se hace referencia a los peróxidos, este término comprende los productos de descomposición primaria de la oxidación de las grasas, por lo que su determinación indicaría que la autooxidación o enranciamiento del aceite ha comenzado. La reacción secundaria y los productos de descomposición que resultan de la oxidación, incluyen compuestos tales como aldehídos, cetonas, ácidos, alcoholes, etc., se trata de la fase final.

La determinación del índice de peróxidos se basa en que éstos oxidan el IK a I₂, el cual se puede valorar con tiosulfato. El índice de peróxidos es el número de miliequivalentes de I que se forman por cada kg de aceite peroxidado.

OBJETIVO:

Determinar el índice de peróxidos (IP) en las muestras de cápsulas omega-3. Las sustancias que oxidan al yoduro potásico (IK) se suponen que son peróxidos, u otros productos similares de la oxidación de las grasas y aceites, por lo que el índice de peróxidos obtenido puede tomarse en una primera aproximación, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la grasa.

FUNDAMENTO:

Se realiza mediante volumetría de una muestra disuelta en ácido acético glacial y cloroformo, y tratada con disolución de yoduro potásico (en presencia de almidón como indicador). El iodo liberado se valora con disolución de tiosulfato sódico (Reglamento (CEE) nº 2568/91).

REACTIVOS:

Para la determinación del índice de peróxidos en cápsulas de aceite de pescado se utilizaron los siguientes reactivos:

- Cloroformo (J.T. Baker, Deventer, The-Netherlands)
- Ácido acético glacial (J.T. Baker, Deventer, The-Netherlands).
- Solución acuosa saturada de yoduro potásico (Panreac, Barcelona, España), recién preparada, exenta de yoduros y yodatos.
- Solución acuosa de tiosulfato sódico (Panreac, Barcelona, España) 0,01N.
- Solución de almidón (Panreac, Barcelona, España), en solución acuosa de 10 g/L, recién preparada con almidón soluble.

MATERIALES:

El material utilizado está exento de sustancias reductoras u oxidantes.

Cápsulas de aceite de pescado omega-3

Se han utilizado cápsulas de aceite de pescado omega-3 para la determinación del índice de peróxidos.

Pipetas de 10 y 25 mL

Para la medición de los reactivos, se han utilizado pipetas graduadas de 10 y 25 mL respectivamente.

Probeta de 100 mL

Para la medición de los reactivos, también se han utilizado probetas de 100 mL.

Matraces con cuello y tapón esmerilados de 250 mL de capacidad previamente secados

Se han utilizado como contenedor del aceite de las cápsulas de aceite de pescado y de los reactivos, cloroformo y ácido acético glacial.

Bureta de 50 mL, graduada en 0,1 mL (patrón), con error inferior a 0,02 mL calibrada a 20°C.

Se ha utilizado para llevar a cabo la valoración con la solución de tiosulfato sódico.

PROCEDIMIENTO:

El ensayo se realizó con luz natural difusa y la muestra se mantuvo refrigerada dentro de envases de vidrio color topacio. La cantidad de muestra a tomar se realizó en función del índice de peróxidos que se proponía, con arreglo a la siguiente tabla:

Tabla 9. Peso de la muestra según el índice de peróxidos

Índice de peróxidos que se supone (meq de O₂/kg)	Peso de la muestra problema (g)
de 0 a 12	de 5,0 a 2,0
de 12 a 20	de 2,0 a 1,2
de 20 a 30	de 1,2 a 0,8
de 30 a 50	de 0,8 a 0,5
de 50 a 90	de 0,5 a 0,3

Adaptado del Reglamento (CEE) n° 2568/91

DETERMINACIÓN:

Se pesan con precisión 2,5 g de aceite en una navecilla de vidrio, se añaden 10 mL de cloroformo y se disuelve, rápidamente, la muestra problema mediante agitación. Se añaden 15 mL de ácido acético y, a continuación, 1 mL de solución de yoduro potásico. Se cierra rápidamente el matraz, se agita durante 1 min y se mantiene en oscuridad durante 5 min exactamente, a una temperatura entre 15 y 25°C. A continuación, se añaden 75 mL aproximadamente de agua destilada y se valora (agitando al mismo tiempo vigorosamente) el yodo liberado con la disolución de

tiosulfato sódico (0,01N) si se presuponen valores superiores a 12, utilizando la solución de almidón como indicador.

Se efectúan tres determinaciones por muestra.

Se realiza, simultáneamente, un ensayo en blanco. Si el resultado del ensayo en blanco sobrepasa 0,05 mL de la solución de tiosulfato sódico 0,01N, se deben sustituir los reactivos.

El Índice de Peróxidos (IP), expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por Kg de aceite, se calcula mediante la siguiente expresión:

$$IP = (V \cdot N \cdot 1000) / P$$

Siendo:

V: mL de tiosulfato sódico utilizados para la muestra problema

N: normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico empleada

P: peso en **gramos** de la muestra problema

El resultado será la media aritmética de las 3 determinaciones efectuadas

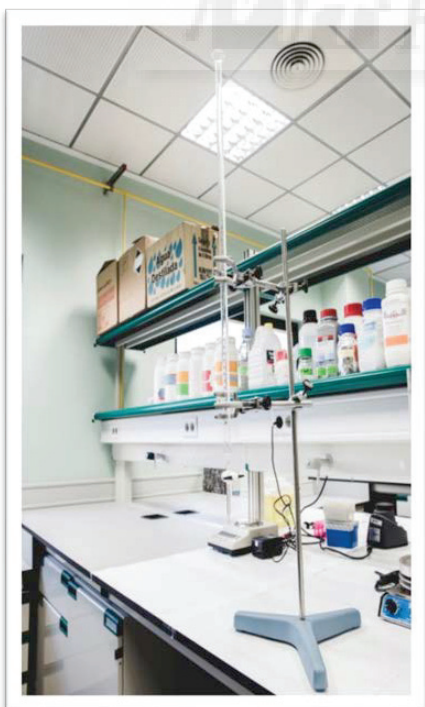


Fig. 3. Bureta

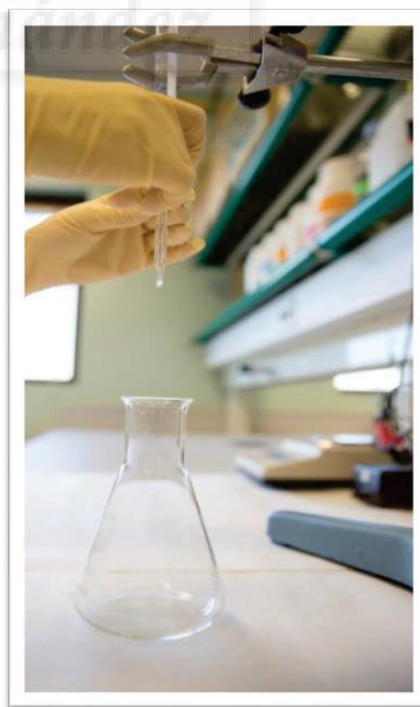


Fig. 4. Determinación IP

3.3. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS): ACEITE DE PESCADO OMEGA-3

PRINCIPIO:

La determinación del nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) constituye una medida del grado de oxidación de las grasas.

Los hidroperóxidos (ROOH) son los productos de reacción iniciales más importantes que se generan al oxidarse los lípidos. Son compuestos lábiles, altamente inestables, que se transforman y degradan al reaccionar con los radicales libres y su ruptura origina productos secundarios tales como pentanal, hexanal, 4-hidroxinonal y malondialdehído (MDA). El MDA, reconocido como uno de los principales productos secundarios de la oxidación de los lípidos, es un dialdehído formado por tres átomos de carbono y con grupos carbonilos en los C-1 y C-3.

Han sido presentadas diversas teorías sobre los posibles mecanismos por los cuales se formaría este compuesto, siendo los hidroperóxidos formados a partir de los ácidos grasos poliinsaturados, con tres o más insaturaciones y que están asociados con los fosfolípidos, sus sustratos primarios en los alimentos de origen animal. No obstante, se ha informado de la producción de menores cantidades de MDA a partir de ácidos grasos mono y diinsaturados. La relación del MDA con la alteración de los lípidos, ha despertado el interés de los investigadores para la elaboración de técnicas que permitan su seguimiento y cuantificación, como medida del proceso de oxidación de los alimentos.

Algunas de las técnicas propuestas se basan en la liberación del MDA, su reacción con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) para la formación de un complejo de color y posterior determinación de la absorbancia de dicho complejo, por técnica espectrofotométrica. Otras técnicas cuantifican el MDA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o por cromatografía de gases. El MDA puede ser, por otra parte, obtenido por hidrólisis ácida de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP) ó 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), en una relación equimolecular, la cual ha sido utilizada para estandarizar el método del TBARS.

La prueba del TBARS es uno de los métodos más utilizados para medir la oxidación de las grasas y aceites. El procedimiento consiste en el calentamiento

conjunto del reactivo y de la muestra y en la medición del color rojo resultante. En la prueba se compara la densidad óptica del complejo de color tiobarbitúrico TBA-MDA con la de un estándar preparado a partir de TEP o TMP. El cromógeno, formado durante la prueba del TBARS, está compuesto por la condensación de dos moléculas de TBA con una de MDA. La expresión de los resultados de la prueba, como el “número de TBARS”, representa los mg de malondialdehído/kg de muestra y de otras sustancias minoritarias de la peroxidación que reaccionan igualmente, con el ácido tiobarbitúrico.

OBJETIVO:

Determinar el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en las muestras de cápsulas de aceite de pescado omega-3, como índice de enranciamiento oxidativo.

FUNDAMENTO:

La determinación del nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) constituye una medida del grado de oxidación de las grasas.

REACTIVOS:

Para la determinación del nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en cápsulas de aceite de pescado omega-3, se utilizaron los siguientes reactivos:

- Fosfatidilcolina de yema de huevo (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL).
- Cloroformo (J.T. Baker, Deventer, The-Netherlands).
- Metanol (J.T. Baker, Deventer, The-Netherlands).
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker, Deventer, The-Netherlands).
- Tampón Tris-EDTA
- BHT (butil-hidroxi-tolueno) (J.T. Baker, Deventer, The-Netherlands).
- Soluciones de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (Panreac, Barcelona, España).

- Solución acuosa 0,01M de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Panreac, Barcelona, España).
- Estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP): a partir de uno de estos reactivos se prepara una solución estándar de 1×10^{-3} M en agua destilada (esta solución debe mantenerse protegida de la luz y en refrigerador (2 a 4°C)) (Panreac, Barcelona, España).
- Solución de sulfanilamida al 0,5% en ácido clorhídrico al 20% (Panreac, Barcelona, España).

MATERIAL:

Agitador de tubos vortex

Se utiliza para mezclar sustancias contenidas en tubos de ensayo o tubos tipo eppendorf, gracias a su movimiento vibratorio. Con funcionamiento en modo continuo o discontinuo al presionar el soporte con el tubo. El modelo utilizado es un Vortex-Vib.

Lector de placas de fluorescencia FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies GMBH.

Lector versátil multimodo para cinco modos de detección: intensidad de fluorescencia (incluyendo FRET), luminiscencia (incluyendo BRET), absorbancia UV/Vis, fluorescencia en tiempo resuelto (incluyendo TR-FRET) y AlphaScreen®/AlphaLISA®.

Estufa (JP Selecta de 52L)

Utilizada para el secado del material y del vidrio de laboratorio utilizado.

Congelador (Liebherr)

Para el almacenamiento de muestras se ha utilizado un congelador, marca Liebherr con temperatura fijada a -20 °C.

Cápsulas de aceite de pescado omega-3

Muestras para la determinación del índice de enranciamiento oxidativo.

Embudos

Los embudos se han utilizado para la transferencia de las disoluciones entre recipientes.

Tubos de centrifuga

Se han utilizado para acelerar la decantación o sedimentación de la fase sólida frente a la líquida.

Pipetas graduadas y aforadas

Las pipetas se han utilizado para medir la transferencia de los distintos reactivos utilizados de un recipiente a otro de forma exacta.

Micropipetas

Las micropipetas se han utilizado para succionar y transferir volúmenes pequeños de las distintas disoluciones empleadas.

Vidrio de reloj

Lámina de vidrio en forma circular cóncava-convexa, que se ha utilizado para pesar los reactivos sólidos.

Tubos de ensayo con tapón roscado

Se han utilizado para contener las disoluciones líquidas utilizadas durante el ensayo.

Gradilla

Herramienta que se ha utilizado como accesorio de soporte para los tubos de ensayo.

Filtro Whatman n°1

Se utiliza para trasvasar el líquido filtrado a los tubos de ensayo, permitiendo el paso a la solución a través de sus poros y evitando el paso de las impurezas insolubles.

Cubetas para espectrofotómetro

Tubos de sección cuadrada de cuarzo que contienen la muestra y no ofrecen absorción en la zona del ultravioleta (UV) ni en la del infrarrojo (IR).

Balanza analítica

Se ha utilizado una balanza de precisión MS104TS (Mettler Toledo), con capacidad máxima de entre 120 g y 320 g y legibilidad 0,01 mg - 0,1 mg.

Centrífuga

La centrífuga modelo (Centro 8-BL JP Selecta) se ha utilizado para acelerar la decantación o sedimentación de las muestras utilizadas durante el ensayo.

Homogeneizador

El homogeneizador modelo (X-1000 JP Selecta), se ha utilizado en el procesamiento de la muestra, permitiendo la disolución y estabilidad de la emulsión.

Baño de agua control termostático

Se introdujo el tubo de ensayo en el baño de agua termostaticado, a 100°C durante 35 min, para el desarrollo del cromógeno formado entre el TBA y el MDA. El modelo utilizado es Corio CD-BC4.

Espectrofotómetro

El espectrofotómetro utilizado es un DR600, en el cual se ha llevado a cabo la lectura de la absorbancia, a una longitud de onda de 532 nm.

PROCEDIMIENTO:

Se pesa una muestra de 4g ($\pm 0,01$ g) de aceite de pescado, colocándolo en un tubo de ensayo (20mm x 200mm). Se adicionan 10 mL de la solución de TCA al 10% y se agita el tubo en un vortex durante 5 min. Se añaden 5 mL de la solución de TBA y se agita en el vortex durante 2 min. Se centrifuga el tubo a 3500 rpm, para separar cualquier sólido en suspensión en la muestra de aceite y trasvasar el líquido filtrado con un papel de filtro Whatman n°1, a un tubo de ensayo (20mm x 200mm). Se lleva el tubo de ensayo a un baño de agua termostaticado, a 100°C, durante 35 min, para el desarrollo del cromógeno formado entre el TBA y el MDA.

Se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

Curva de calibrado:

- A partir de la solución estándar de TMP se preparan disoluciones adecuadas para obtener de 1×10^{-8} moles de malondialdehído en 5 mL.

- Alícuotas de 5 mL de cada una de la diluciones, se hacen reaccionar con 5 mL de TBA y se incuban durante 35 min en un baño termostatzado con agua a 100°C, para el desarrollo del cromógeno entre el TBA y el MDA.
- Transcurrido este tiempo, se leen las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm, previa lectura del blanco correspondiente.
- Con las concentraciones utilizadas y los datos de las absorbancias obtenidas, se elabora la curva de calibrado.

Para la calibración del espectrofotómetro y para la correlación de la absorbancia de las muestras se prepara un blanco, en el cual se reemplaza el peso de la muestra por un peso equivalente de agua destilada.

DETERMINACIÓN:

Se mezclan 0,25 mg de fosfatidilcolina de yema de huevo (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) con un 4% molar de omega-3 en cloroformo/metanol 1:1. La mezcla se secó con N₂ y se mantuvo a vacío durante 2 h. El lípido seco se resuspendió en 1 mL de tampón Tris-EDTA mediante agitación vigorosa, para formar vesículas multilamelares y se incubó durante 1 hora a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 mL de BHT 4% (p/v) y congelando las muestras a -20°C.

Las sustancias liposolubles fueron extraídas en 2 mL de 1-butanol y la fluorescencia de las TBARs fue medida a 500/530 nm (excitación/emisión) usando un lector de placas de fluorescencia FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies GMBH. La disolución patrón de MDA se realizó a partir de una disolución al 20% de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en tampón a pH 3,5 añadiendo 400 mL de HCl 1N para favorecer la hidrólisis del producto. Los valores de TBARs se expresaron en mg de TBARs/kg de aceite.

Los resultados se expresan en número de TBARs (mg de malondialdehído/kg de muestra) multiplicando la absorbancia leída en el espectrofotómetro por un factor K, el cual se obtiene de la siguiente fórmula:

$$K = S/A \times MW \times 10^6/E \times 100/P$$

Siendo:

S = concentración estándar/5 mL (1×10^{-8} moles de tetramethoxypropano)

A = absorbancia del estándar

MW = peso molecular del malondialdehído (164,2 g/mol)

P = porcentaje de recuperación. Para calcularlo se agrega una concentración conocida de malondialdehído a una muestra con la que se efectúa la prueba del TBARs. Por comparación de la absorbancia obtenida (Y) con la que se obtiene con dicha concentración de MDA en la curva de calibrado (Y') se obtiene el valor P:

$$P = Y \times 100/Y'$$

Siendo:

E = equivalente de muestra, el cual se obtiene de la siguiente ecuación:

$$E = \text{g de muestra} \times \text{mL analizados} / \text{mL de dilución}$$

Para una muestra de 20 g, diluida a un volumen de 100 mL, de los cuales se analizan 5 mL, el equivalente de muestra es 1.



Fig. 5. Espectrofotómetro DR600

3.4. DETERMINACIÓN DE LA MEDIDA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN ULTRAVIOLETA (K_{232} , K_{270} y K_{280}): ACEITE DE PESCADO OMEGA-3

PRINCIPIO:

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar información sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

Estos métodos se basan en medidas de los coeficientes de extinción aproximadamente a 232, 270 y 280 nm, representados por K_{232} , K_{270} , K_{280} , respectivamente, correspondientes a la absorción máxima de los dienos y trienos conjugados. Los valores de esta absorción se expresan en extinción específica $E^{1\% 1\text{ cm}}$ (extinción de una solución de la materia grasa al 1% en el disolvente especificado, en un espesor de 1 cm) que se designa convencionalmente como K, también denominado “coeficiente de extinción” (reglamento (CEE) n° 2568/91).

Cuando se calientan los ácidos grasos poliinsaturados no conjugados en presencia de un catalizador alcalino, tiene lugar una isomerización en la que la posición de los dobles enlaces cambia a una forma conjugada. Las uniones conjugadas dan lugar a unas características e intensas bandas de absorción en la zona del espectro comprendido entre 200 y 400 nm, en tanto que la absorción de los dobles enlaces aislados en dicha zona es muy débil. Es en esta propiedad, en la que se basa el método de absorción ultravioleta, para la determinación de las absorciones a una longitud de onda determinadas (232, 270 y 280 nm) y que se deben a la presencia de sistemas diénicos y triénicos.

Las reacciones de autooxidación están asociadas con la conjugación debido a la formación de enlaces carbono-carbono o carbono-oxígeno, que causan un aumento de absorción entre 225 y 325 nm. Los hidroperóxidos conjugados absorben a 232 nm, mientras los productos de la oxidación secundaria (aldehídos y cetonas) absorben a otras longitudes de onda (262, 268, 270 y 274 nm), con un máximo a 270 nm.

Coefficientes altos de extinción UV, están relacionados con la oxidación o con el desdoblamiento de productos formados durante el almacenamiento del aceite, con el refinado o con ambas cosas a la vez. Los valores bajos de absorbancia corresponden a aceites de buena calidad.

La espectrofotometría ultravioleta es, por tanto, uno de los medios más seguros para conocer el estado de oxidación y conservación de un aceite.

OBJETIVO:

Determinar la medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta (K_{232} , K_{270} , K_{280}) en las muestras de cápsulas omega-3.

FUNDAMENTO:

Este método se fundamenta en la medida espectrofotométrica ultravioleta del coeficiente de extinción a las longitudes de onda de extinción 232, 270 y 280 nm, representados por K_{232} , K_{270} y K_{280} , respectivamente. Ambos coeficientes se emplean como criterio de calidad y de pureza de los aceites.

REACTIVOS:

Para la determinación de la medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta (K_{232} , K_{270} y K_{280}) en las cápsulas de aceite de pescado omega-3, se utilizó el reactivo ciclohexano (Sigma-Aldrich, Palo Alto, CA, USA) para espectrofotometría, cuyos valores mínimos de transmisión serán: 40% a 220 nm y 95% a 250 nm.

MATERIAL:**Cápsulas de aceite de pescado omega-3**

Se han utilizado cápsulas de aceite de pescado omega-3 para la determinación del índice de peróxidos.

Espectrofotómetro ultravioleta (DU® SERIE 520)

General Purpose UV/Vis Spectrophotometer Beckman Coulter. La escala de longitudes de onda permitirá medir entre 200 y 300 nm con precisión de 1 nm.

Cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor

Tubos de sección cuadrada de cuarzo que contienen la muestra y no ofrecen absorción en la zona del UV ni en la del IR.

Thermomixer confort (Eppendorf 2 mL)

Se utiliza para mezclar y atemperar simultáneamente el material de la muestra.

Balanza analítica

Se ha utilizado una balanza de precisión MS104TS (Mettler Toledo), con capacidad máxima de entre 120 g y 320 g y legibilidad 0,01 mg - 0,1 mg.

Agitador de tubos vortex

Se utiliza para mezclar sustancias contenidas en tubos de ensayo o tubos tipo eppendorf, gracias a su movimiento vibratorio, con funcionamiento en modo continuo o discontinuo al presionar el soporte con el tubo. El modelo utilizado es un Vortex-Vib.

PROCEDIMIENTO:

En primer lugar, se pesa el aceite de pescado en los eppendorf de 2 mL y en una thermomixer confort (eppendorf 2 mL) se induce la oxidación del aceite de pescado omega-3 a 60°C, durante 1,5 h. A continuación, se dejan durante dos días los eppendorf

abiertos, bajo condiciones de luz y aire, con el fin de incrementar la oxidación de dichos aceites. Se pesan 40 mg de cada muestra de aceite de pescado en matraces aforados de 50 mL y se enrasa con ciclohexano. Los matraces se tapan con los tapones de vidrio y se agitan en un vortex, para conseguir una mezcla homogénea entre la muestra y el disolvente. En la cubeta de 1 cm de espesor, se mide la extinción a 232, 270 y 280 nm, utilizando ciclohexano como patrón de comparación. Por cada 3 lavados con ciclohexano, se realiza un lavado con la muestra patrón a medir. Finalmente, se introduce la cubeta con la muestra a medir en el espectrofotómetro, con un barrido que oscila entre 200 y 300 nm de longitud de onda. Las muestras se miden por triplicado para cada longitud de onda: 232, 270 y 280 nm.

Finalmente, se toman 10 puntos más de la curva para obtener resultados más representativos.

DETERMINACIÓN:

Se calcula la extinción específica a las longitudes de onda de 232, 270 y 280 nm de cada uno de los aceites de pescado analizados. El valor K es:

$$K_{\lambda} (l) = A/C \cdot E_{\lambda}$$

Siendo:

K_{λ} (I): Extinción específica a la longitud de onda λ

A: Absorción leída en el espectrofotómetro a la longitud de onda (λ)

C: Concentración de disolución del aceite en el disolvente (g/100mL)

E_{λ} : Espesor en cm de la cubeta

El resultado será la media aritmética de las 3 determinaciones efectuadas. Los resultados deben expresarse con dos cifras decimales.



Fig. 6. Espectrofotómetro ultravioleta (DU® SERIE 520)

3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN SEMILLA DE LINO

3.5.1. TOMA Y ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron 13 marcas comerciales de semilla de lino, que se obtuvieron tras la realización de un barrido en Oficinas de Farmacia y en establecimientos destinados a su venta, parafarmacias, tiendas dietéticas y grandes superficies, distribuidas por toda la ciudad de Elche (Alicante). Las marcas comerciales de semilla de lino se caracterizan por sus distintas presentaciones:

Tabla 10. Presentación de las distintas muestras de semilla de lino

Muestras	Dorada	Marrón	Presentación
A			Aceite virgen de lino
B			Perlas de aceite
C			Perlas de aceite
D			Perlas de aceite
1	✓		Entera
2	✓		Entera
3	✓		Entera
4	✓		Entera
5	✓		Entera
6		✓	Entera
7	✓	✓	Triturada (mezcla dorada/marrón)
8	✓		Molida/pasterizada
9	✓		Triturada

Una vez en el laboratorio, las muestras se conservaron protegidas de la luz y de la humedad, y se mantuvieron a temperatura ambiente, imitando las condiciones de almacenamiento comerciales hasta la realización de las distintas determinaciones. Los parámetros determinados por soxhlet, ultrasonidos y rancimat se han realizado por duplicado. El parámetro color se ha determinado por cuadruplicado.

Para la determinación de los parámetros de calidad, se han aplicado los métodos oficiales de análisis recogidos en (AOAC, 2005).

3.5.2. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO SOXHLET

PRINCIPIO:

La extracción se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible. Se pueden realizar desde los tres estados de la materia, denominados:

1. Extracción sólido-líquido en caliente: utilizada en la obtención de principios activos de los tejidos vegetales. Ésta es la que se ha utilizado para la extracción del aceite de la semilla de lino.

2. Extracción líquido-líquido: se utiliza en química analítica, cuando se extrae el producto de una reacción efectuada en fase líquida con un solvente específico para separar uno o algunos de los componentes.
3. Extracción gas-líquido (lavado de gases): es el burbujeo por una fase líquida de un gas que se quiere lavar o purificar.

El proceso de extracción de la mayoría de las sustancias tiene muy baja eficiencia, es decir, una vez que se agrega el solvente, lo que está en contacto íntimo con lo extraíble se satura enseguida, por lo que hay que filtrar y volver a tratar con solvente fresco. Ello implica gran cantidad y mucha manipulación del solvente además de la atención personalizada que la operación requiere. Muchas veces, lo que se quiere recuperar es el extracto y no la muestra extraída, por lo que habrá que evaporar todo el solvente para recuperarlo. Por otro lado, estas tareas deben realizarse en una campana espaciosa, dado que los solventes se suelen utilizar calientes, es decir, con una alta tensión de vapor. Lo que hace el extractor soxhlet es realizar un sinnúmero de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa, llegando siempre de manera pura al material.

OBJETIVO:

Determinar la cantidad del aceite extraído de las distintas muestras de semilla de lino analizadas.

FUNDAMENTO:

El extractor soxhlet permite realizar una extracción a temperaturas superiores a la del ambiente, es decir, recuperar el solvente después de la extracción utilizando el rotavapor.

REACTIVOS:

Para la extracción de aceite procedente de semilla de lino con equipo soxhlet se utilizaron los siguientes reactivos:

- Éter de petróleo (Sigma-Aldrich, St. Louis, US-Mo)
- Éter dietílico estabilizado con ~ 6 ppm de BHT PRS (Panreac-Barcelona- España).
- N-hexano (Panreac-Barcelona-España)

MATERIAL:

Semilla de lino

La semilla de lino que se ha utilizado para llevar a cabo la extracción de aceite mediante el equipo soxhlet, ha sido semilla de lino entera, molida y triturada, de las variedades dorada, marrón y mezcla de dorada y marrón.

Molinillo de café

Se ha utilizado el molinillo de café (Moulinex A505 2 HF), para moler las distintas muestras de semilla de lino.

Filtros de celulosa

Se han utilizado cartuchos de celulosa, grado 30, hechos 100% de hebras de algodón con un contenido de celulosa alfa > 95%, para la determinación de grasas en la extracción por soxhlet.

Extractor soxhlet

Para la extracción del aceite procedente de la semilla de lino, se ha utilizado un extractor tipo soxhlet modelo 60003286 (J.P. Selecta, Barcelona, España).

Centrífuga

La centrífuga modelo (Centro 8-BL JP Selecta) se ha utilizado para acelerar la decantación o sedimentación de las muestras utilizadas durante el ensayo.

Rotavapor

El rotavapor R-205 (Büchi, Flawil, Switzerland), se ha utilizado para separar por medio de evaporación a presión reducida (<100 mbar) a 40°C, el disolvente del aceite extraído.

PROCEDIMIENTO:

Preparación de la muestra: se trituraron 20 g de semilla de lino cruda con un molinillo de café (Moulinex A505 2 HF), durante 1 min, con el fin de romperla en fragmentos de menor tamaño. Una vez la muestra está triturada, se llena el cartucho de extracción y se introduce en el balón.

Cartuchos de extracción: se han utilizado cartuchos de celulosa, grado 30 con forma cilíndrica, están 100% hechos de hebras de algodón con un contenido de celulosa alfa > 95%. Se fabrican de acuerdo al estándar alemán DIN 12449 para que quepan en los dispositivos soxhlet de acuerdo a los estándares DIN 12602 y 12604.

La cantidad de muestra la condiciona el tamaño del cartucho y éste el del extractor. Es por eso que existen varios tamaños de soxhlet y es conveniente, antes de comenzar a trabajar, definir cuál es la medida que se requiere.

Tapón del cartucho: una vez cargado el material, se debe colocar un tapón en caso que la muestra flote para evitar que salga del mismo. El más utilizado es el que está hecho con una torunda de algodón envuelta, o no, en gasa. Dado que las paredes del cartucho suelen ser ásperas, hay que conseguir que el tapón llegue al fondo por medio de los dedos o de una espátula. Es conveniente asegurarse que no se estén introduciendo extractivos con el algodón, por lo que se recomienda realizar el lavado previo de una provisión del mismo, así ya se tiene para futuras necesidades. Aunque los algodones actuales vienen lavados, no está mal asegurarse de eliminar restos de aceites que pueda contener. En el caso del trabajo con madera, se puede lavar con la mezcla de una parte de alcohol y dos de benceno, con la que se determinan los llamados “extractivos”.

Colocación del solvente: la cantidad de solvente debe ser la necesaria para que, al ascender al cartucho y antes que se haga la sifonada no quede en seco el balón inferior, porque de esa manera, o se seca la muestra y se quema, o cuando caiga el líquido de la sifonada sobre el vidrio recalentado, se puede producir una explosión de los vapores, con el consiguiente riesgo de accidente. Si la cantidad a agregar no está estipulada en la norma, se carga el solvente desde arriba, lentamente, para que vaya cubriendo el cartucho y luego produzca el rechupe. Ésta es la cantidad mínima. Pero como durante la operación hay pérdida del solvente por evaporación y además, debe quedar una cantidad mínima en el balón para que no se concentre el extracto demasiado, hay que agregar por lo menos, una cantidad semejante en exceso.

Solventes a utilizar: Con frecuencia, particularmente en los laboratorios de investigación, se suelen realizar extracciones no normalizadas. Por eso es conveniente saber el rango de estas sustancias que se pueden utilizar en el extractor soxhlet. La experiencia que se posee es que, hay una temperatura máxima y mínima de ebullición en la que el equipo funciona adecuadamente. En el extremo inferior se encuentra el

diclorometano (cloruro de metilo) que se utiliza para la extracción de grasas y resinas de manera selectiva. Este solvente tiene un punto de ebullición de 40°C, muy cercano a la temperatura ambiente en climas cálidos. Cuando se efectúa una extracción con el agua de refrigeración a 26°C, se pierde más de la mitad del solvente. Con respecto al extremo superior, hay que decir que para la cantidad de energía limitada que generan los calentadores eléctricos comunes, a medida que aumenta el punto de ebullición, disminuye significativamente el caudal del solvente que se evapora, y por ende, la velocidad de extracción.

Sin embargo, hay que hacer notar que, además del punto de ebullición es importante el calor latente de evaporación. Así, por ejemplo, se puede trabajar con esencia de trementina con cierta facilidad, aunque se evapore a 145°C. No obstante, las extracciones con agua se hacen demasiado lentas, casi al punto de que no sean factibles.

Tabla 11. Solventes utilizados en las extracciones con soxhlet

DISOLVENTE	PUNTO DE EBULLICIÓN (°C)
Éter de petróleo	35-80
Éter dietílico	34,6
N-Hexano	69

Otra característica importante, en cuanto al tipo de solventes, es que los de carácter no polar suelen tener alguna dificultad en sifonar puesto que no mojan el vidrio. Ello es frecuente con los derivados clorados como el diclorometano y el cloroformo y los hidrocarburos superiores al hexano. En los casos en los que se utilice mezcla de solventes, como en la extracción de la madera, es imprescindible trabajar con mezclas azeotrópicas, porque de otra manera la extracción sería heterogénea en cuanto a la composición del solvente. En el caso citado se utilizan dos partes de benceno y una de etanol, que es prácticamente la del azeótropo, 67,6% y 32,4%, respectivamente.

Calentamiento: Es corriente utilizar calentadores eléctricos, de esos llamados múltiples, como el que se ve en la figura 7, que además poseen reóstatos para variar el tiempo en el que las resistencias están encendidas. Habitualmente tienen varios puntos. En el primero, las resistencias están casi todo el tiempo apagadas y en el último, no cortan nunca. La práctica habitual es que, al inicio de la operación se pongan en máximo para llevar el equipo a régimen, esto es el punto indicado como “MAX” o “HI” por la abreviatura de “high” en inglés, para luego ir regulándolo en función de la

velocidad de extracción que pida la norma o requiera la operación. Dichas normas suelen pedir un número de sifonadas por hora. Con las calidades de vidrio borosilicato actuales, no hace falta colocar un dissipador de calor (plancha de amianto) entre el calentador y el balón, salvo que se trabaje con mechero de gas.

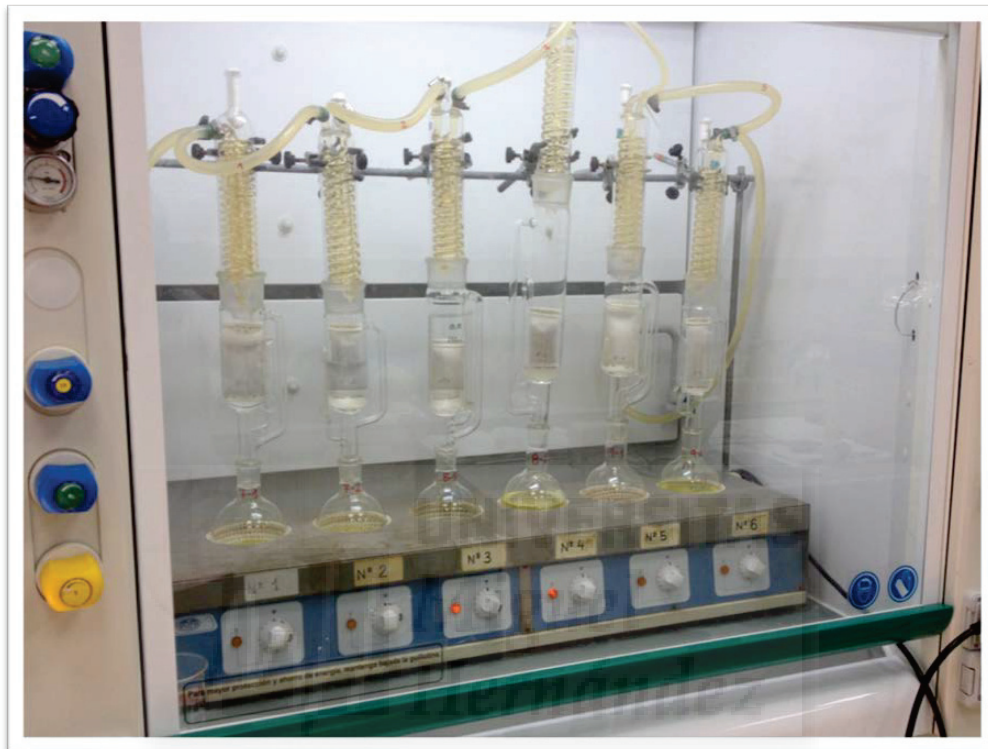


Fig.7. Equipo soxhlet

Con alguna frecuencia sucede que al comienzo de la evaporación, el solvente se sobrecalienta y posteriormente, produce una evaporación explosiva que hace que gran cantidad de vapores lleguen al refrigerante, que no da abasto en la condensación. Inclusive, puede darse que, si el equipo no está bien sujeto en los dos lugares necesarios, es decir, en el balón y en el extractor, salte la parte superior y escapen vapores calientes del solvente, circunstancia que puede ser peligrosa. Si lo que se va a utilizar es el residuo sólido, se pueden colocar núcleos de evaporación en el balón, como trozos de porcelana porosa o piedra pómez. En el caso de tener que cuantificar el extracto, se conoce una sola forma segura de evitar el sobrecalentamiento y es introduciendo un trozo de capilar de teflón, de manera que toque la pared del balón en dos partes diferentes.

Refrigeración: La ubicación de las mangueras es de gran importancia, dado que al haber seis refrigerantes habrá doce conexiones de agua. Las conexiones se pueden realizar en serie o en paralelo. La conexión en serie es más práctica, usa menos mangueras y requiere de una sola canilla y un solo desagüe. Su única limitación es el aumento de la temperatura del agua de refrigeración, a medida que el mismo líquido pasa de un refrigerante al otro. Un defecto es que el sistema quede como un todo y si se saca un equipo, hay que colocar las mangueras de nuevo. En el sistema en paralelo o individual, cada equipo tiene su entrada y salida de agua independiente, por lo que se requerirán más canillas y más desagües, aunque se puede instalar un sistema de grifo con varias salidas y un colector de efluentes. El flujo de agua debe regularse para utilizar solamente lo necesario, dado que el consumo es muy alto, particularmente en el caso de que se use agua potable del grifo.

Operación de extracción: Una vez que el equipo está preparado, el agua del refrigerante abierta, el cartucho cargado con la muestra e introducido el solvente, se enciende el calentador y comienza la operación. Cuando el solvente llega a la temperatura de ebullición, éste comienza a evaporarse, las paredes del equipo se calientan, comienza a condensar en el refrigerante y a caer en forma de gotas sobre el cartucho. La primera operación es totalmente atípica y no debe contabilizarse en el recuento que se hace para regular la velocidad de extracción, como suelen pedir las normas. A medida que el condensado va cayendo sobre el cartucho, éste comienza a escurrir por la parte inferior del mismo, llenando el recipiente de extracción hasta que llega al nivel de la bajada del sifón y rechupa, con todo el material disuelto hacia el balón inferior. El tope del sifón está por encima del cartucho, para asegurar que en cada ocasión el material a extraer quede embebido en el solvente.

Una vez que el sistema está en régimen, las sifonadas se producen a intervalos regulares. Los tiempos comunes del sifonado están entre 5 y 20 min, según la potencia del calentador, el solvente, la temperatura externa, etc.

La cantidad de sifonadas están estipuladas en la norma que se use, pero hay ocasiones en las que se trabaja en sistemas sobre los que no se posee información. Para eso, es interesante saber con alguna aproximación, el comportamiento general de la extracción. Con ese fin, se puede utilizar un equipo de extracción que tiene adosado un grifo en la parte inferior con el que se pueden extraer muestras, sin tener que desarmar el equipo. En una curva general de extracción, en función del número de sifonadas, se

puede ver que las primeras son las que más material disuelven y luego la curva se hace más asintótica. Este mecanismo de extracción es lógico y normal, dado que al comienzo hay mucho material para extraer y dentro de él hay fracciones de fácil separación, pero a medida que avanza el proceso, cada vez es más difícil extraer la pequeña fracción remanente, hasta que en las etapas finales no se extrae nada más. Como en todo, este tipo de procesos es de importancia capital definir el punto final, que dependerá del sistema conformado por el equipo, la muestra y las condiciones de temperatura.

Culminación de la operación: una vez que se ha dado por terminada la operación de extracción, es conveniente esperar un cierto tiempo para que el sistema se enfríe hasta que sea fácil manipularlo. A continuación, no hay que olvidarse de cerrar el agua de refrigeración para no realizar consumo innecesario. Después, se desarma el equipo y se extrae el cartucho que está saturado de solvente, se coloca en un sitio aireado o en la campana, para que se seque la muestra. La extracción de la muestra del cartucho húmedo puede ocasionar su deterioro. Si es necesario, se deberá enjuagar el extractor para que quede listo para la próxima vez. Y con esto, se da por terminada la operación de extracción.

Rotavapor: finalizada la fase de extracción, se llevan los balones (con aceite y solvente) del soxhlet al evaporador (rotavapor). Se trata de un dispositivo rotatorio que se utiliza para la eliminación eficiente y suave de disolventes, con lo cual la muestra se evapora a presión reducida.

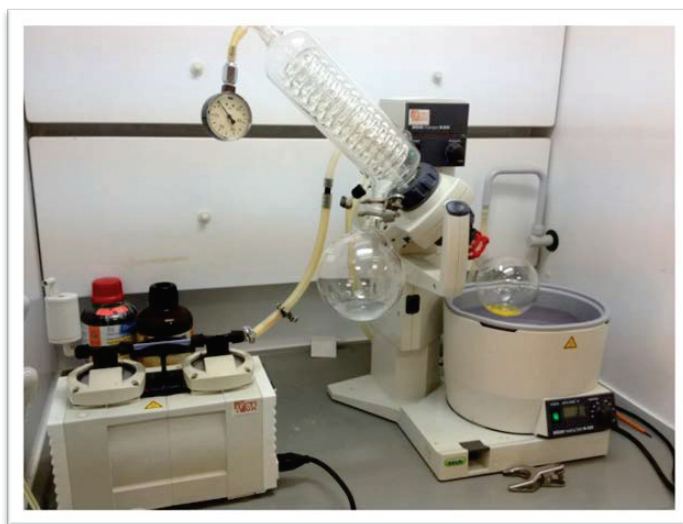


Fig 8. Rotavapor

DETERMINACIÓN:

Para la extracción de grasa de las muestras, los cálculos se expresan en porcentaje de peso:

$$\% \text{ de grasa} = (P' - P/P'') \times 100$$

Siendo:

P = peso, en g, del matraz

P' = peso, en g, del matraz con grasa

P'' = peso, en g, de la muestra

Se realizaron 2 repeticiones por muestra.



EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLA DE LINO (SOXHLET)

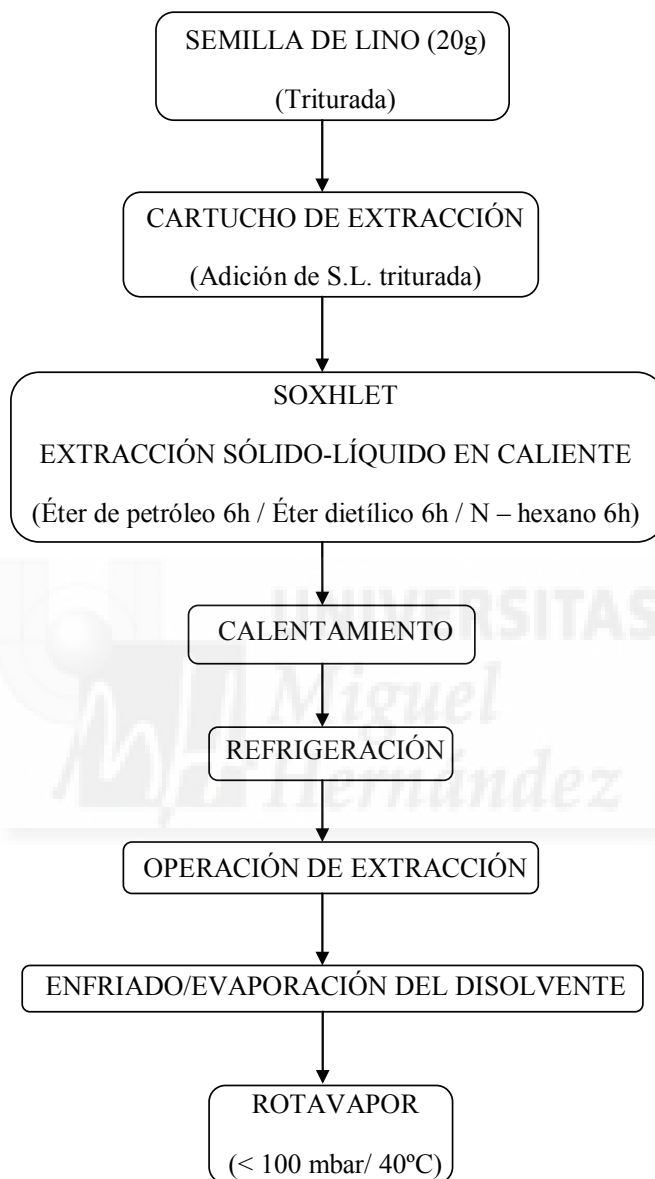


Fig 9. Diagrama de flujo de la extracción de aceite de semilla de lino mediante soxhlet

3.5.3. METILACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE LA SEMILLA DE LINO

PRINCIPIO:

Los ácidos grasos son cadenas iguales o superiores a 6 átomos de carbono, no son lo suficientemente volátiles para examinarlos fácilmente por cromatografía de gases y por ello, deben ser esterificados.

La esterificación les proporciona un grupo metilo que les confiere una menor polaridad y una mayor volatilidad. Por lo tanto, las muestras deben ser hidrolizadas y transesterificadas previamente, lo que permite obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs).

Los ácidos grasos se metilaron in situ según el método de Park y Goins, (1994) con algunas modificaciones. Básicamente, 20 mg de aceite de semilla de lino hidrolizado se transfirieron a un tubo de ensayo con 20 mg de C17:0 (ácido heptadecanoico) y 1 mL de n-hexano como patrón interno. A continuación, se adicionaron 100 µL de dicloruro de metano y 1 mL de NaOH 0,5 N en metanol y los tubos se calentaron en un baño de agua a 90°C, durante 10 min. Se añadió 1 mL de BF₃ en metanol y la mezcla se dejó a temperatura ambiente (25°C) durante 30 min, para prevenir la intransomerización de los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) (Chin et al., 1992). A continuación, se añadió 1 mL de agua ultra pura (Milli-Q) y 600 µL de hexano y los FAMEs se extrajeron tras la agitación vigorosa durante 1 min.

Después de la centrifugación (3000 rpm-5 min), las alícuotas se secaron con sulfato de sodio anhidro y la capa superior se transfirió a un vial purgado con nitrógeno, que se almacenó a -20°C hasta que las muestras se analizaron por cromatografía de gases.

OBJETIVO:

Determinar la composición de los distintos ácidos grasos, es decir, la longitud de las cadenas hidrocarbonadas y el grado de insaturación (presencia de dobles enlaces entre los átomos de carbono), que contiene la semilla de lino de 9 marcas comerciales diferentes.

FUNDAMENTO:

La cromatografía de gases es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna. La elución se produce por flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito. Su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

La cromatografía gas-líquido (GLC), también llamada GC, es la que se utiliza más ampliamente. Como fase estacionaria utiliza moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte. La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de líquidos. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno) y el detector.

REACTIVOS:

Para llevar a cabo la metalización de los ácidos grasos, en las distintas muestras de semilla de lino analizadas, se han utilizado los siguientes reactivos:

- Ácido heptadecanoico (en polvo) $\geq 98\%$. Sigma-Aldrich (St. Louis-USA)
- Hidróxido de sodio (lentejas). Technoquim S.L. Murcia. (España)
- Hexano (95%) Lab Scan Analytical Sciences. Dublín (Irlanda)
- Diclorometano. Sigma-Aldrich (St. Louis-USA)
- Metanol. Panreac. Barcelona (España)
- Trifluoruro de boro (14% en metanol). Sigma-Aldrich (St. Louis-USA)
- Sodio sulfato anhidro. Panreac. Barcelona (España)

MATERIAL:**Cromatógrafo de gases**

El cromatógrafo de gases utilizado es un Hewlett Packard GC System mod. 6890, equipado con un inyector tipo Split/splitless y un detector de ionización de llama (FID).

Tabla 12. Detalle de las condiciones cromatográficas

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Inyector	Pulsed splitless
Gas portador	H ₂ , flujo constante
T ^a de columna	Rampa
T ^a inyector	220°C
T ^a detector	240°C
Detector	FID

Bajo estas condiciones cromatográficas se obtuvo el cromatograma (figura 38), el cual consta de 10 de los ácidos grasos más importantes. Posteriormente, se definieron los tiempos de retención tabulados en la tabla 38, para ello se consideró el cromatograma de la figura 38.

Centrífuga

La centrífuga modelo (Centro 8-BL JP Selecta) se ha utilizado para acelerar la decantación o sedimentación de las muestras utilizadas durante el ensayo.

Balanza analítica

Se ha utilizado una balanza de precisión MS104TS (Mettler Toledo), con capacidad máxima de entre 120 g y 320 g y legibilidad 0,01 mg-0,1 mg.

Baño

Se ha utilizado un baño de agua Precistern de 20L (J.P. Selecta, Barcelona, España), con temperaturas regulables desde +5°C hasta 100°C, estabilidad $\pm 1^\circ\text{C}$.

Agitador de tubos vortex

Se utiliza para mezclar sustancias contenidas en tubos de ensayo o tubos tipo eppendorf, gracias a su movimiento vibratorio. Con funcionamiento en modo continuo o discontinuo al presionar el soporte con el tubo. El modelo utilizado es un Vortex-Vib.

Placa agitadora

La placa agitadora, también conocida como mezclador, se ha utilizado para disolver la disolución preparada, mediante un imán agitador (mosca).

Tabla 13. Principales ácidos grasos identificados

ÁCIDOS GRASOS		
Nombre común	Nombre sistemático	Nomenclatura
Mirístico	Tetradecanoico	14:0
Pentadecílico	Pentadecanoico	15:0
Palmitoleico	9-Hexadecanoico	16:1 n-7
Palmítico	Hexadecanoico	16:0
Linoleico	9,12-Octadienoico	18:2 n-6
γ -Linolénico	6,9,12-Octadecatrienoico	18:3 n-6
Oleico	9-Octadecanoico	18:1 n-9
Estearico	Octadecanoico	18:0
Araquídico	Eicosanoico	20:0
Behénico	Docosanoico	22:0

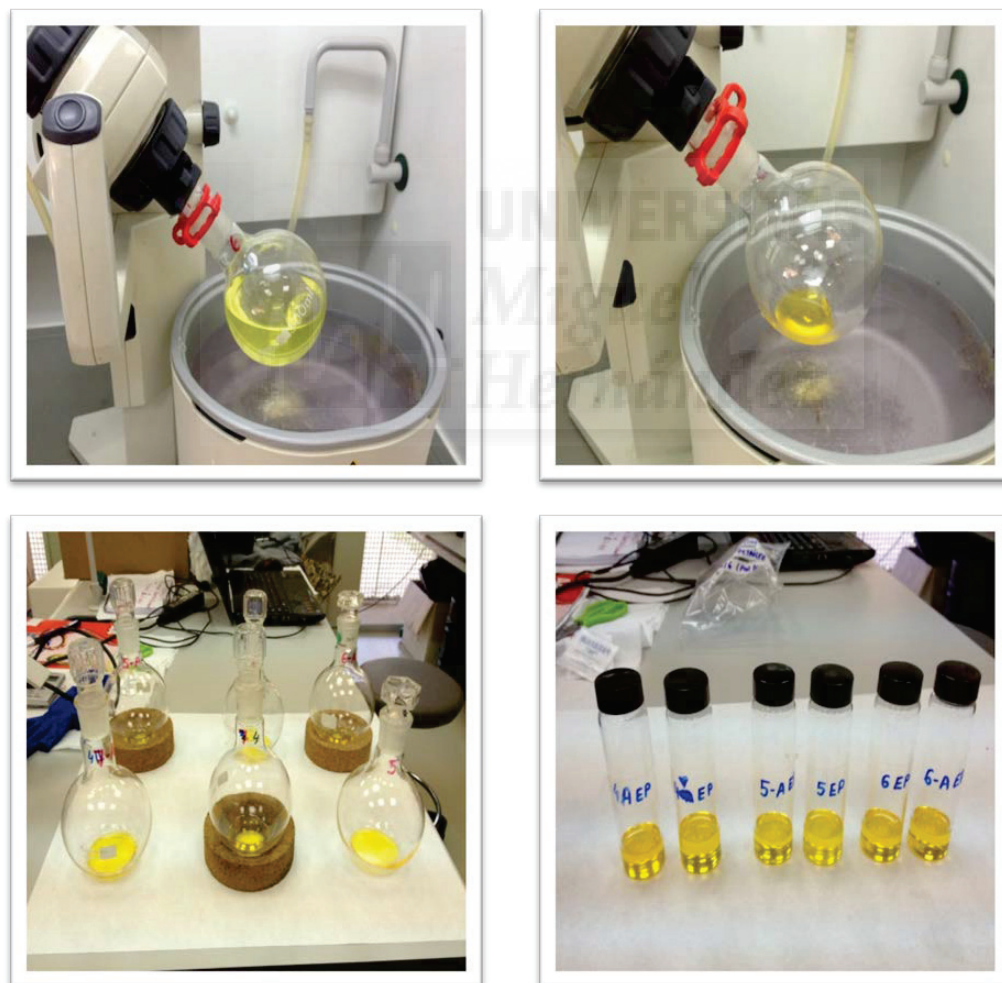


Fig 10. Proceso de extracción del aceite (para su metilación) mediante rotavapor

PROCEDIMIENTO:**ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

La composición de ácidos grasos de los FAME se analizó por cromatografía de gases (Hewlett Packard 6890 equipado con un detector de ionización de llama (FID)) y una columna capilar DB-23 (longitud de 30 m, 0,25 μm film, 0,25 mm de diámetro interno; J&W Tecnología Científica Agilent). El caudal de flujo del gas portador (helio) fue 1,2 mL/min y 35 mL/min en el punto de formación. La temperatura del inyector fue 200°C y 220°C el detector. El volumen de inyección fue 0,5 μL (sin división). El programa de temperatura utilizado fue: temperatura inicial 70°C, temperatura de 70 a 190°C a 10°C/min durante 20 min, de 190 a 240°C a 5°C/min y a 240°C mantenida isotérmicamente durante 3 min.

DETERMINACIÓN:

La identificación de los picos de FAME se realizó comparando los tiempos de retención de los estándares de la FAME. El software Agilent tecnologías (G2072aa Rev.A.05.02 Chemstation) se utilizó para la integración de los picos. Las concentraciones de CLA de ácidos grasos en semilla de lino se expresaron como mg/100 g de muestra, usando factores de respuesta que se determinaron previamente. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

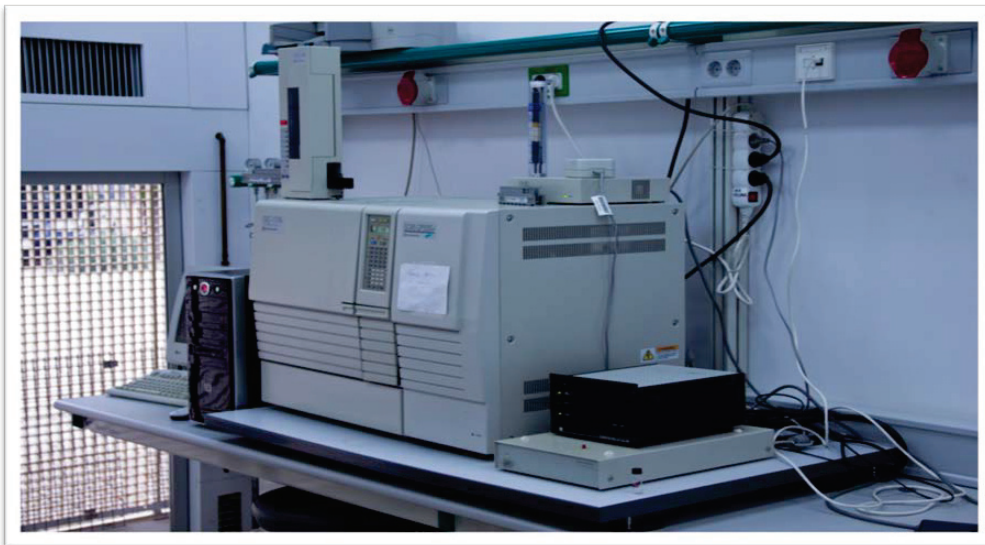


Fig. 11. Cromatógrafo de gases

3.5.4. ULTRASONIDOS

PRINCIPIO:

Ultrasonidos, es un recipiente de doble cuerpo, construido totalmente en acero inoxidable. Consta de un dispositivo de vaciado, filtro antiparásito, reloj desconectador y calefacción regulable (según modelo).

Sus aplicaciones son varias, desde el laboratorio en general: aceleración de reacciones químicas, desgasificación de líquidos, disrupción de células, limpieza de tamices, pipetas, micropipetas, cubetas, viscosímetros, descomposición de sustancias radioactivas, aceleración de la extracción de aceites, etc.

En general, los métodos analíticos estándar utilizados para la extracción de aceites de los alimentos, conllevan mucho tiempo y un considerable coste económico (Metherel et al., 2009). Según los métodos oficiales de análisis (AOAC, 2005) y la organización internacional de normalización (ISO) (Luque-García, 2004) se requieren entre 4 y 14 horas para obtener la extracción de los mismos.

La extracción de aceites, mediante ultrasonidos de matrices sólidas, tales como la semilla de lino, ha determinado que la obtención de perfiles de ácidos grasos es cualitativamente similar a las técnicas convencionales y ha reducido considerablemente, los tiempos de extracción en la muestra (aproximadamente 1 hora) (Luque-García, 2004; Ruíz-Jiménez, 2004; Cravotto, 2008), en comparación con el método de extracción soxhlet.

El ultrasonidos también se aplica en la extracción de fenoles (Ahn, 2007), ginsenósidos (Wu, 2001), antraquinonas (Hemwimol, 2006) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Christensen, 2005; Richter, 2006).

La sonicación produce cavitación o formación y colapso de burbujas microscópicas que liberan gran energía en forma de calor, presión y corte mecánico (Chemat et al., 2004). Además, se ha demostrado que, la energía ultrasónica mejora la extracción de tejidos vegetales, mediante la acción acelerada de la rehidratación o hinchazón de las células de la planta, acompañada por la fragmentación de la matriz tisular (Toma et al., 2001), lo que conlleva la transferencia de masa y penetración del disolvente en la célula, favoreciendo la absorción del contenido de células en el disolvente (Vinatoru et al., 1997).

OBJETIVO:

Aplicación de ultrasonidos para la extracción de aceite de la semilla de lino, con distintos disolventes orgánicos en un equipo de ultrasonidos.

FUNDAMENTO:

Para reducir el tiempo de análisis, recientemente, se ha propuesto el uso de microondas y ultrasonidos enfocados para acelerar la extracción del aceite (Toma, et al., 2001).

REACTIVOS:

Para llevar a cabo la extracción de aceite de semilla de lino con distintos disolventes orgánicos en un equipo ultrasonidos, se han utilizado los siguientes reactivos:

- Éter de petróleo (Sigma-Aldrich, St. Louis, US-MO).
- Éter dietílico estabilizado con ~ 6 ppm de BHT PRS (Panreac-Barcelona-España).
- N-Hexano (Panreac, Barcelona, España).

MATERIAL:

Semilla de lino

Se han utilizado varias muestras de semilla de lino, entera, triturada y molida, dorada, marrón y mezcla de dorada y marrón.

Molinillo de café

El molinillo de café utilizado ha sido Taurus, Modelo Aromatic, 230V-50HZ, 150W Barcelona, (España).

Ultrasonidos

El equipo de ultrasonidos utilizado para la extracción del aceite de semilla de lino mediante distintos disolventes es: J.P. Selecta, Barcelona, España. Modelo: CD3000683 N°330131, HZ-50-W100.

Centrífuga

La centrífuga modelo (Centro 8-BL JP Selecta) se ha utilizado para acelerar la decantación o sedimentación de las muestras utilizadas durante el ensayo.

PROCEDIMIENTO:

Se añade 1 g de muestra (semilla de lino triturada) a un tubo de vidrio con tapa de rosca, a continuación, añadimos 3 mL de disolvente (éter de petróleo, éter dietílico y n-hexano) y se cierra la tapa. Se ponen los viales en un baño de ultrasonidos, durante 3 h, a temperatura ambiente y agitamos varias veces. Transcurridas las 3 h, ponemos el vial en la centrífuga durante 10 min a 3500 rpm, con el fin de separar el aceite del disolvente. Se coge el sobrenadante con una pipeta de vidrio y se añade a un nuevo vial, para eliminar los restos de disolvente que hayan quedado en el vial, utilizando gas nitrógeno.

DETERMINACIÓN:

Las determinaciones se realizaron por duplicado.



Fig. 12. Ultrasonidos

EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLA DE LINO (ULTRASONIDOS)

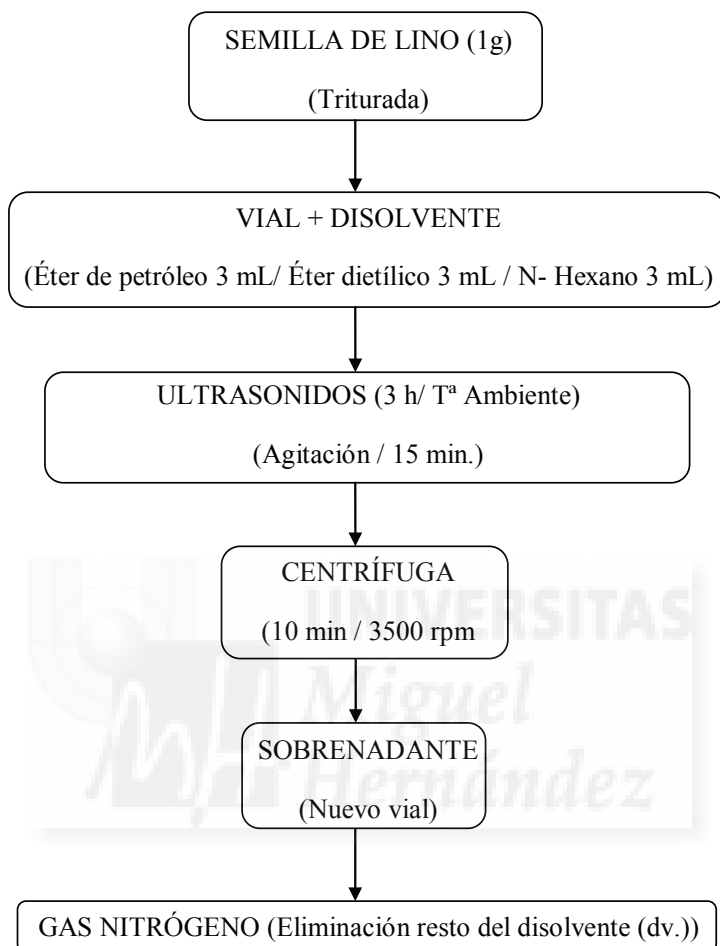


Fig 13. Diagrama de flujo de la extracción de aceite de semilla de lino mediante ultrasonidos

3.5.5. RANCIMAT

PRINCIPIO:

Es un método de medida de estabilidad oxidativa de aceites y grasas en condiciones aceleradas, basado en la inducción de la oxidación de la muestra por exposición a elevadas temperaturas y flujo de aire.

OBJETIVO:

Determinar por el método rancimat el período de inducción en 13 muestras de aceites de semilla de lino, en sus diferentes formas de presentación:

- Aceite virgen de lino
- Aceite de lino en perlas
- Aceite obtenido de semilla de lino entera, molida y triturada (dorada, marrón y mezcla de dorada y marrón)

FUNDAMENTO:

El método rancimat es por tanto, una herramienta fundamental en la valoración tecnológica y de garantía de seguridad de aceites y grasas, permitiendo además, la evaluación y optimización de estrategias de estabilización de aceites y grasas, mediante compuestos antioxidantes.

MATERIAL:

Aceite de semilla de lino

Se han utilizado 2,5 g de aceite de semilla de lino para la realización del ensayo rancimat.

PROCEDIMIENTO:

La oxidación acelerada de los aceites vírgenes de semillas de lino se llevó a cabo utilizando un equipo Methrom Rancimat 743 apparatus (Metrohm, Switzerland). En este equipo se pueden establecer diferentes condiciones de temperatura y flujo de aire, por lo que este ensayo se diseñó según las condiciones que se mencionan a

continuación, para los aceites de semilla de lino. El procedimiento analítico consiste en pesar en un tubo de reacción una masa de 2,5 g de cada aceite, introducir posteriormente cada tubo en un bloque calefactor, previamente programado a la temperatura de trabajo establecida, en este caso a 120°C, conectar la toma de aire al aparato y la salida de aire a los frascos de borboteo, donde permanecen alojadas las correspondientes células de medida de la conductividad. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y a los resultados se les aplicó un análisis de varianza, para verificar la presencia o ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Las condiciones utilizadas en el rancimat para la determinación de los períodos de inducción en los diferentes aceites estudiados, fueron las siguientes:

- Cantidad de muestra: 2,5 g
- Flujo de aire: 20 L/h
- Temperatura: 120°C
- Tiempo total de análisis en el aparato: aproximadamente 3 h.

DETERMINACIÓN:

Las determinaciones se realizaron por duplicado.



Fig. 14. Rancimat

3.5.6. DETERMINACIÓN DE COLOR

PRINCIPIO:

La aceptación o rechazo de un alimento, o su preferencia respecto a otro, depende de la información sensorial percibida (Depledt, 1988), siendo el color la primera característica sensorial apreciada por el consumidor (Rodríguez et al., 1992). Esta impresión óptica se relaciona, de inmediato, con distintos aspectos relacionados con la calidad del producto (Tafoya y García, 1993; Cambero et al., 1998).

El color es una sensación subjetiva, resultado de una compleja serie de respuestas fisiológicas y psicológicas a la radiación electromagnética de longitudes de onda comprendidas en el intervalo de 400-700 nm (Pérez-Álvarez, 1996).

El color observado en los cuerpos depende del tipo de radiaciones absorbidas o reflejadas al recibir un haz de rayos de luz blanca (Von Elbe y Schwartx, 2000). Por ello, el color se puede definir como, la impresión que produce en la vista la luz reflejada por un cuerpo (Madrid et al., 1994). Un cuerpo absorbe cuando incide sobre él una luz blanca, a unas determinadas longitudes de onda, en función del color que sea. La parte de luz que no es absorbida se refleja y aparece un color. La luz que se percibe como color y la luz que es absorbida por el objeto son complementarias. De ello se deduce que, un objeto blanco refleje la totalidad de las ondas, mientras que un objeto negro las absorbe todas (Prändl, et al., 1994).

OBJETIVO:

Controlar la calidad de color, consistencia y apariencia de las muestras, ayudando a determinar si éstas cumplen con los estándares definidos.

MATERIAL Y APARATOS:

Colorímetro Minolta

El modelo Kónica Minolta Chroma Meter CR-410 (Serie B8406705/664/1837) Japan, se ha utilizado para evaluar el color de la superficie de la semilla de lino.

PROCEDIMIENTO:

La muestra se vierte sobre una placa Petri y se tapa con el cristal de baja reflectancia. La medida de color se realiza directamente sobre el cristal.

CÁLCULOS:

Los parámetros de color estudiados, pertenecientes al espacio de color CIEL*A*B* son las coordenadas de color: luminosidad (L^*), rojo/verde (a^*) y amarillo/azul (b^*). La coordenada L^* recibe el nombre de claridad o luminosidad y puede tomar valores entre 0 y 100. Las coordenadas colorimétricas (a^* , b^*) forman un plano perpendicular a la luminosidad. La coordenada a^* define la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad hacia el rojo, si a^* es negativa (Pérez-Álvarez, et al., 1999). El conjunto de estas tres magnitudes define el color de un estímulo, pero no son suficientes para definir el color. Para ello, se calculan las magnitudes psicofísicas Cromo (C^*) y Tono (H^*), (Anzaldúa, 1994; Loughrey, 2000; Jiménez y Gutiérrez, 2001).

El Cromo (C^*) es la propiedad por la cual un color se distingue por su diferente saturación y se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

El Tono (H^*) representa la sensación visual por la que se diferencian los colores. Se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$H^* = \arctg (b^* + a^*)$$

DETERMINACIÓN:

Se realizaron cuatro medidas por muestra.



Fig. 15. Colorímetro

3.6. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN FARMACÉUTICA

Actualmente, son numerosas las Oficinas de Farmacia que ofrecen a sus pacientes el servicio denominado “autocontrol asistido de indicadores biológicos”. Desde que empezó a utilizarse, ha permitido, en no pocos casos, detectar enfermedades ocultas, así como analizar los principales indicadores de riesgo de las patologías más prevalentes.

Según las últimas revisiones, los tratamientos no farmacológicos procedentes de distintas fuentes de omega-3, que combinan actuaciones de actividad física y dieta hipocolesterolemizante, han demostrado tener un alto perfil de efectividad y seguridad. Este programa pretende dar respuesta a la detección de parámetros alterados, sin llegar a ser patológicos, ofreciendo una atención farmacéutica adecuada al usuario para la mejora de su salud.

En el marco de la atención Farmacéutica Nutricional, el objetivo es: “Brindar asesoramiento nutricional con el fin de mejorar hábitos alimentarios, y de esta manera, reducir los factores de riesgo asociados a las enfermedades metabólicas, mejorando la calidad de vida del paciente”. El objetivo principal que se ha planteado es el desarrollo de un protocolo **PAFPDUMH^{diet}** (Protocolo de Actuación Farmacéutica Preventiva Dietética) para llevar a cabo la consulta de indicación farmacéutica, con garantías de profesionalidad y seguridad para los usuarios.

3.6.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR QUE SE PUEDEN CONTROLAR DESDE LA OFICINA DE FARMACIA

En el caso de la enfermedad cardiovascular, los principales factores etiológicos son la edad, el sexo, las hiperlipemias, el tabaquismo, la hiperglucemia, la obesidad y la hipertensión arterial. La mayor parte de estos factores de riesgo, salvo la edad y el sexo, son modificables, por lo que la educación sanitaria y la concienciación del paciente son fundamentales.

Dichos factores pueden ser controlados por el propio paciente, siempre y cuando esté debidamente asesorado por un profesional de la salud. Así pues, algunas de las posibilidades diagnósticas y de autocontrol que la Oficina de Farmacia puede ofrecer al paciente con posible riesgo cardiovascular son:

- **Mediante química seca:** determinación de colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, glucosa, GPT (transaminasa glutámico-pirúvica), ácido úrico y creatinina, fundamentalmente.
- **Mediante tensiómetro:** determinación del riesgo de hipertensión arterial, frecuencia cardíaca en reposo.
- **Mediante consejo personalizado:** peligros del tabaquismo y la inactividad física, control de la dieta.

Las actividades y servicios, en torno al autocontrol asistido, que la Oficina de Farmacia pone a disposición de las clientes-usuarias-pacientes, tiene como principales ventajas:

- Incrementar la oferta de servicios.
- Realizar el seguimiento farmacológico de manera rápida, sencilla y fiable.
- Facilitar la realización de varias mediciones relacionadas.

En la figura 16 aparece el esquema del Protocolo Normalizado de Trabajo (PNT) aplicado.

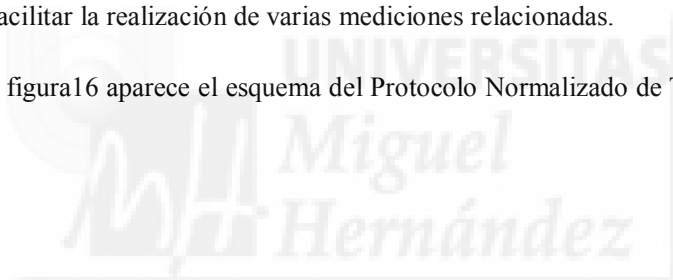
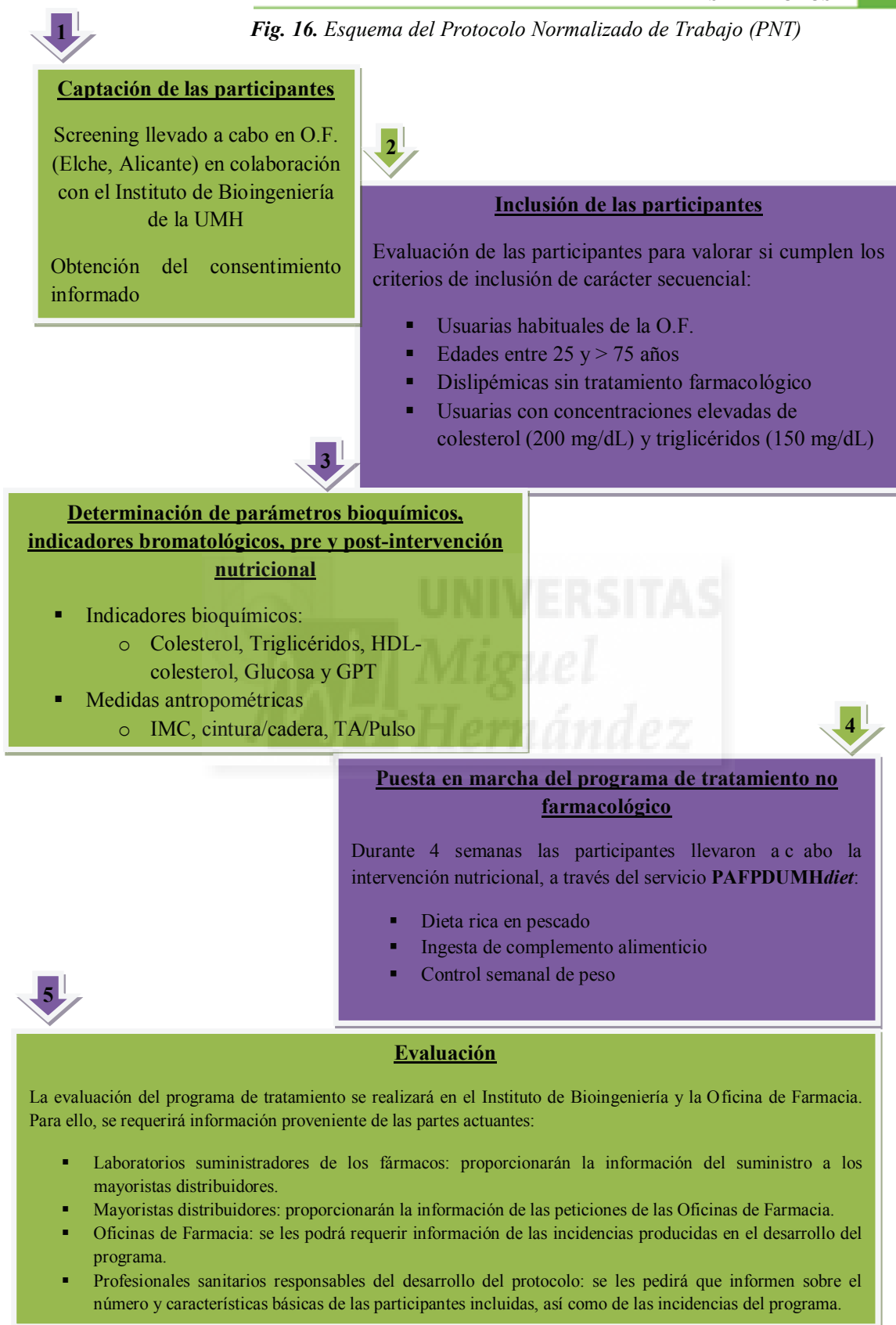


Fig. 16. Esquema del Protocolo Normalizado de Trabajo (PNT)



3.7. SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS PARTICIPANTES

3.7.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO Y POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

Se dirigió la investigación a usuarias habituales de una Oficina de Farmacia sita en C/ Doctor Caro, 101, 03201, Elche, Alicante. La población total en el municipio alcanza los 227.312 habitantes (INE 2015), de los cuales 114.529 son mujeres y cuya densidad de población es de 706,06 hab./Km².



Fig 17. Farmacia IBORRA



*Fig 18. Doctoranda Vanessa M. García Hernández y
Lcda. M^a Asunción Iborra Campos*

Se eligió dicha Oficina de Farmacia, por la disposición de su propietaria a colaborar, de forma desinteresada, con la Universidad Miguel Hernández (UMH) de Elche, con la que además colabora desde hace varios años, ofreciendo la oportunidad a alumnos y alumnas de la misma a llevar a cabo el desarrollo de prácticas en su especialidad. Así como, por su estratégica ubicación a escasos metros de un conocido y céntrico colegio, especialmente frecuentado por mujeres, con rango de edad y características muy propicias para alcanzar los objetivos perseguidos en estos estudios.

Doña M^a Asunción Iborra Campos abrió las puertas de su Oficina de Farmacia para llevar a cabo el desarrollo de dos estudios experimentales, ejecutados en el período comprendido entre octubre de 2010 y abril de 2013. Las usuarias que frecuentan la Oficina de Farmacia son mujeres, en un 97% de nacionalidad española y de clase media; casadas, con hijos, y un 56% de las mismas trabaja fuera de casa.

Se trata de dos estudios experimentales, del tipo ensayos clínicos a simple ciego aleatorizados y controlados de intervención dietética (Declaración de Helsinki, 2008). Todas las participantes firmaron un consentimiento informado, siendo aprobado el protocolo por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH).

- Modelo acuerdo farmacéutico-paciente (ver anexos)
- Consentimiento informado (ver anexos)
- Test de cumplimiento terapéutico y conocimiento de los fármacos (ver anexos)
- Hoja de medicación de la participante (ver anexos)
- Encuesta nutricional (adaptada de AESAN, 2010) (ver anexos)
- Tarjeta de seguimiento durante la intervención nutricional (ver anexos)
- Dieta rica en pescado (1900-2000 kcal) (ver anexos)

El investigador, por su parte, disponía de los siguientes documentos para la posterior evaluación y análisis de los resultados de las participantes:

- Encuesta nutricional
- Hoja de punción capilar pre y post-intervención, donde se especifican cada uno de los parámetros que se iban a determinar, así como las medidas antropométricas

- Test de cumplimiento terapéutico y conocimiento de los fármacos
- Hoja de medicación del paciente



Fig. 19. Zona de entrevista a las participantes

3.8. DETERMINACIÓN DE INDICADORES BIOLÓGICOS

PRINCIPIO:

Los farmacéuticos son los profesionales de asistencia sanitaria más accesibles a la sociedad. Como tales, están en situación de proporcionar una detección precoz de enfermedades crónicas y de identificar estilos de vida poco saludables.

El farmacéutico sensibiliza a la población en materia de salud y prevención, ofreciendo la posibilidad de un control de los principales indicadores de riesgo:

- Rápido, cómodo y fiable
- Orientado a descubrir trastornos, frecuentemente, asintomáticos y desconocidos
- Actuando preventivamente

El autocontrol de indicadores biológicos asistido por el farmacéutico, viene realizándose en la farmacia con el nombre de *Rapid Control Plus* (Roche® Diagnostic).

Sus principales características son:

- Como muestra sólo se necesita una gota de sangre capilar
- El dispositivo es fácil de calibrar mediante las correspondientes tiras de calibración, existen varias tiras, una para cada indicador, colesterol, colesterol HDL, triglicéridos, glucosa, GPT, entre otras
- Disponen de memoria para almacenar los resultados indicando la fecha y hora de su obtención
- Las tiras para medición pueden conservarse a temperatura ambiente
- Los resultados se obtienen en un espacio de tiempo muy reducido: colesterol (180 segundos), triglicéridos (174 segundos), glucosa (12 segundos), GPT (60 segundos) y HDL-colesterol (180 segundos)

OBJETIVOS

Realizar pruebas de detección precoz y autocontrol, que permitan analizar los principales indicadores de riesgo cardiovascular, colesterol total, triglicéridos, glucosa y GPT en un tiempo mínimo, aproximadamente 5 minutos, mediante punción capilar. Sistema basado en los avances de la denominada química seca.

Los reactivos y sustancias auxiliares de la reacción se impregnan sobre un material constituido por papel y posteriormente, sufren un tratamiento de secado. Se logra una gran estabilidad de los componentes que lo constituyen. Los reactivos inician una reacción química cuando entran en contacto con un solvente (plasma, sangre).



Fig. 20. Rapid Control (Reflotrón® Plus)

3.8.1. MATERIAL NECESARIO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR

- Lancetas
- Capilares
- Algodón
- Alcohol 96°
- Guantes de látex
- *Rapid Control Plus* (Roche® Diagnostics)



Fig. 21. Guantes, alcohol y algodón

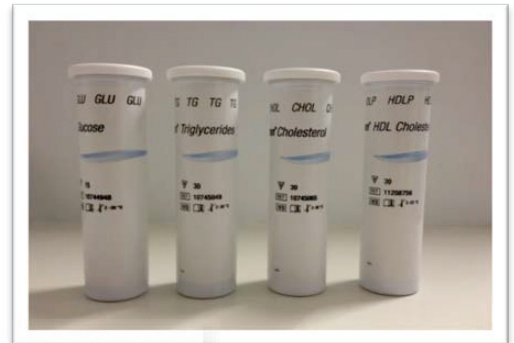


Fig. 22. Tiras reactivas



Fig. 23. Lancetas, aplicador, capilares + soporte y tiras reactivas

3.8.2. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR

Sujetar el dedo, para evitar movimientos bruscos, y rodearlo congestionándolo para favorecer el flujo de sangre. La zona adecuada para realizar la punción es el lateral de la yema del dedo. Limpiar, con el algodón humedecido, la zona de punción, posteriormente, con el algodón seco realizar una frotación que favorezca la irrigación en la zona. Retirar el protector de la lanceta Safe-T-Pro Plus. Ajustar la profundidad y pinchar presionando el botón superior.

Sin presionar el dedo, retirar con el algodón seco el resto de sangre del pinchazo. Proceder al llenado del capilar, tocando con el extremo del capilar la gota de sangre, nunca el dedo. Durante el llenado debe realizarse una masaje a lo largo del dedo para favorecer la salida de sangre.

Mantener el extremo del capilar que recoge la sangre hacia abajo, para evitar la entrada de aire. Llenar el capilar hasta la marca central del mismo. Cada determinación requiere un capilar.

Para evitar la formación de coágulos, agitar el capilar desplazando la sangre a lo largo del interior del capilar 2 o 3 cm, para homogeneizar con el anticoagulante (heparina) que recubre el capilar. Colocar los capilares llenos en el portacapilares. Introducir la tira en la cámara de medición. Una vez aplicada la sangre en la tira, no esperar más de 15 segundos. Esperar el tiempo correspondiente dependiendo del tipo de tira para obtener su lectura, y retirar la misma del aparato.



Fig. 24. Llenado del capilar con la muestra de sangre



Fig. 25. Traspase de la sangre del capilar a la tira reactiva



Fig. 26. Registro de los datos obtenidos de cada uno de los parámetros bioquímicos

3.8.3. INDICADORES BIOLÓGICOS ANALIZADOS

3.8.3.1. COLESTEROL TOTAL

El colesterol, es el factor de riesgo más importante en relación con la enfermedad cardiovascular, ya que determina la formación de la placa de ateroma con la consiguiente aterosclerosis, que antes o después, puede taponar las arterias. Según la arteria afectada, causará lesiones en diferentes órganos: corazón, cerebro, abdomen, extremidades inferiores, etc. El principal problema del colesterol es que, su elevación en sangre no produce síntomas a corto plazo, por lo que pasa totalmente inadvertido si no se realiza cualquier analítica de rutina en un momento dado.

La determinación del colesterol está indicada en aquellos sujetos con uno o varios factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, diabetes, hipertensión, sexo masculino, edad y antecedentes familiares).

REACTIVOS:

- Tiras reactivas *Reflotrón* de COLESTEROL

MATERIAL:

- Lancetas
- Capilares
- Algodón
- Alcohol 96°
- Guantes de látex
- *Rapid Control Plus* (Roche® Diagnostics)

PROCEDIMIENTO:

Se esteriliza el dedo y, con ayuda de la lanceta, se obtiene la muestra sanguínea con la cual llenamos el capilar. A continuación, con la muestra del capilar se impregna la tira de colesterol y se introduce en el *Rapid Control*. Transcurridos 180 segundos se obtienen los resultados.

RESULTADOS:

Si las cifras de colesterol exceden los 270 mg/dL, la usuaria necesitará tratamiento farmacológico. Cuando las cifras de colesterolemia se sitúen entre 200 y 270 mg/dL, frecuentemente, la modificación de los hábitos dietéticos será suficiente para que los valores vuelvan a la normalidad. El paciente puede hacerse el autoanálisis de colesterol a cualquier hora del día, sin que sea necesario un período de ayuno previo.

3.8.3.2. COLESTEROL HDL

El perfil lipídico lo constituye la cuantificación analítica de una serie de lípidos, que son transportados en sangre por diferentes tipos de lipoproteínas plasmáticas. La determinación de estos parámetros, es un procedimiento analítico básico para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades metabólicas, primarias o secundarias. Sin embargo, el colesterol transportado por las HDL (colesterol bueno), representa aquella fracción de colesterol que se transporta al hígado para su metabolización y excreción por vía biliar, y no se asocia con riesgo de enfermedad.

REACTIVOS:

- Tiras reactivas Reflotrón de HDL COLESTEROL (plasma)

MATERIAL:

- Lancetas
- Capilares
- Algodón
- Alcohol 96°
- Guantes de látex
- *Rapid Control Plus* (Roche® Diagnostics)

PROCEDIMIENTO:

Se esteriliza el dedo y, con ayuda de la lanceta, se obtiene la muestra sanguínea con la cual llenamos el capilar. A continuación, con la muestra del capilar se impregna la tira de HDL colesterol y se introduce en el *Rapid Control*. Transcurridos 180 segundos se obtienen los resultados.

RESULTADOS:

Las cifras óptimas de HDL colesterol en mujeres es > 65 mg/dL. Cuando las cifras de HDL colesterol se sitúen por debajo de dicho valor, frecuentemente, la modificación de los hábitos dietéticos será suficiente para que los valores vuelvan a la normalidad. El paciente puede hacerse el autoanálisis de HDL colesterol a cualquier hora del día, sin que sea necesario un período de ayuno previo.

3.8.3.3. TRIGLICÉRIDOS

Los triglicéridos elevados constituyen un factor de riesgo cardiovascular, ya que junto con el colesterol, contribuyen a la formación de la placa de ateroma. Una elevación de los niveles sanguíneos de triglicéridos incrementa el riesgo de cardiopatía coronaria, especialmente, en presencia de otros factores de riesgo, tales como diabetes y obesidad. La hipertrigliceridemia puede ser de tipo primario (genética, a modo de ejemplo, puede citarse la hipertrigliceridemia familiar) o secundario (diversas situaciones y hábitos de vida). Por lo tanto, el autocontrol de los triglicéridos estará indicado en los siguientes casos:

- Antecedentes familiares de hipertrigliceridemia
- Sobrepeso y obesidad
- Tabaquismo
- Consumo excesivo de alcohol
- Consumo excesivo de hidratos de carbono
- Diabetes tipo 2
- Patología renal

REACTIVOS:

- Tiras reactivas *Reflotrón* de TRIGLICÉRIDOS

MATERIAL:

- Lancetas
- Capilares
- Algodón
- Alcohol 96°
- Guantes de látex
- *Rapid Control Plus* (Roche® Diagnostics)

PROCEDIMIENTO:

Se esteriliza el dedo y, con ayuda de la lanceta, se obtiene la muestra sanguínea con la cual llenamos el capilar. A continuación, con la muestra del capilar se impregna la tira de triglicéridos y se introduce en el *Rapid Control*. Transcurridos 174 segundos se obtienen los resultados.

RESULTADOS:

El autoanálisis de los triglicéridos requiere que la usuaria esté en ayunas. Si la trigliceridemia supera los 200 mg/dL, el paciente debe acudir a su médico, pues es muy probable que requiera tratamiento farmacológico.

3.8.3.4. GLUCOSA

La glucosa es el indicador de riesgo empleado para el control de la diabetes. El diabético, especialmente si padece diabetes tipo 1, debe hacerse el autocontrol a diario. Es conveniente realizar la medición en los siguientes casos: en ayunas (inmediatamente antes de comer o dos horas después de la última ingesta), en situaciones que puedan descompensar la enfermedad (vómitos, fiebre, ejercicio, malestar) y a cualquier hora del día (simple curiosidad, sin que la medición vaya ligada a ninguna rutina).

REACTIVOS:

- Tiras reactivas *Reflotón* de GLUCOSA

MATERIAL:

- Lancetas
- Capilares
- Algodón
- Alcohol 96°
- Guantes de látex
- *Rapid Control Plus* (Roche® Diagnostics)

PROCEDIMIENTO:

Se esteriliza el dedo y, con ayuda de la lanceta, se obtiene la muestra sanguínea con la cual llenamos el capilar. A continuación, con la muestra del capilar se impregna la tira de glucosa y se introduce en el *Rapid Control*. Transcurridos 12 segundos se obtienen los resultados.

RESULTADOS

Los valores obtenidos deben estar dentro de los siguientes márgenes:

- Ayunas: 80-130 mg/dL
- Dos horas después de la ingesta: 80-160 mg/dL

La automedida de la glucemia no debe circunscribirse sólo al paciente diabético; dicha medición es aconsejable también en:

- Mayores de 45 años
- Personas con antecedentes familiares de diabetes
- En casos de poliuria, polifagia y polidipsia
- Obesidad

- Embarazo
- Personas con otros factores de riesgo (hipertensión, fumadores, hiperlipemia)
- Personas con tolerancia disminuida a la glucosa o glucemia basal elevada

3.8.3.5. GPT

Las transaminasas son enzimas que cumplen una función metabólica en el interior de las células y se encuentran presentes en muchos órganos (hígado, corazón, riñones, músculos, etc.). El nivel de concentración de las transaminasas en sangre refleja la actividad del hígado y del corazón.

Las dos transaminasas más importantes son:

- La transaminasa glutamicopirúvica (GPT) o Alanina Aminotransferasa (ALT)
- La transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) o Aspartato Aminotransferasa (AST)

El aumento de estas enzimas en sangre indica la existencia de una lesión celular en el hígado, el corazón, los riñones o en los músculos. En nuestro estudio únicamente, hemos analizado la enzima GPT o ALT, que es la que se encuentra principalmente, en el hígado y en los riñones y en pequeña cantidad, en los glóbulos rojos y en los músculos estriados.

En muchas ocasiones, los resultados de un análisis de sangre no son suficientes para confirmar un diagnóstico, dado que ningún resultado de cualquier análisis de sangre es suficiente para confirmar el diagnóstico de una enfermedad.

Un aumento del nivel de transaminasas no siempre indica la presencia de una anomalía. De modo que, antes de confirmar la presencia de ésta, es necesario realizar otro examen algunas semanas después, así como realizar otros análisis (de Gamma GT, de Fosfatasa Alcalina y de Bilirrubina) que permitan evaluar la actividad hepática.

Las patologías más habituales en las que se produce un aumento de las transaminasas son:

- Enfermedades del hígado: hepatitis, excesivo consumo de alcohol, cirrosis y todas aquellas enfermedades en las que se depositan sustancias en el hígado de forma excesiva, como la grasa (esteatosis hepática o hígado graso)

- Enfermedades del páncreas: cuando se inflama el páncreas, ya sea por el alcohol o por infecciones víricas
- Enfermedades del corazón: es muy frecuente la elevación de las transaminasas en el infarto agudo de miocardio y en la insuficiencia cardíaca aguda
- Alteraciones musculares: sobre todo, cuando hay destrucción de nuestros músculos por quemaduras, ejercicio excesivo, etc
- Enfermedades autoinmunes, obesidad, sobrepeso
- Consumo de anticonceptivos orales y de medicamentos antiepilépticos

Los niveles de transaminasas en sangre disminuyen:

- Durante el embarazo
- En caso de insuficiencia de vitamina B6

REACTIVOS:

- Tiras reactivas *Reflotón* de GPT

MATERIAL:

- Lancetas
- Capilares
- Algodón
- Alcohol 96°
- Guantes de látex
- *Rapid Control Plus* (Roche® Diagnostics)

PROCEDIMIENTO:

Se esteriliza el dedo y, con ayuda de la lanceta, se obtiene la muestra sanguínea con la cual llenamos el capilar. A continuación, con la muestra del capilar se impregna

la tira de GPT y se introduce en el *Rapid Control*. Transcurridos 12 segundos se obtienen los resultados.

RESULTADOS:

Los valores de transaminasas varían según el sexo, la edad, la temperatura corporal y el índice de masa corporal. En el hombre varían entre 10 y 40 UI/L y en la mujer varían de 6 a 25 UI/L.

Recordar que el hígado es la mayor fábrica del cuerpo humano y, casi siempre, se altera por la ingesta, alimentación y hábitos inadecuados.

3.9. INDICES ANTROPOMÉTRICOS Y PRESIÓN ARTERIAL ANALIZADOS

Las medidas antropométricas fueron realizadas por un mismo grupo de personas entrenadas, con objeto de conseguir una mayor uniformidad en las medidas. Las participantes se sometieron a una evaluación antropométrica, que incluyó medida de peso, talla, IMC, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera (índice cintura cadera). El procedimiento para obtener estas medidas se basó en los criterios estandarizados de medida, incluidos en el Consenso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad del año 2007 (Rubio et al., 2007).

3.9.1. IMC (ÍNDICE DE MASA CORPORAL)

PRINCIPIO:

El índice de masa corporal (IMC), también llamado Índice de Quetelet (IQ) o Body Mass Index (BMI), es una medida de presión (Kg/m^2) que se emplea como índice y no como peso ideal.

OBJETIVOS:

Determinar el IMC (índice de masa corporal) por ser indicador de las distintas situaciones nutricionales y por la correlación que tiene con el porcentaje de tejido adiposo, así como por su amplia aplicación a gran parte de los sectores de la población.

Es una medida independiente del sexo y de la edad de la persona.

MATERIALES:

- Báscula de precisión TECNILAB



Fig.27. Báscula de precisión y tallímetro

PROCEDIMIENTO:

El peso y la talla fueron medidos mediante una báscula de precisión (TECNILAB) que, a su vez, incorpora tallímetro. El cliente-usuaria-paciente se sube al peso y se sitúa erguido frente al tallímetro, fijando la vista en el punto de luz, que es el que determina su altura exacta. Transcurridos unos segundos, se obtiene el ticket con el peso y la talla real del cliente-usuaria-paciente.

DETERMINACIÓN:

A partir de las medidas del peso y la talla se calcula el IMC, según la fórmula del Índice de Quetelet o Índice de masa corporal (IMC) (peso del sujeto expresado en kg dividido por la talla elevada al cuadrado (Kg/m^2)). El IMC se obtiene tras el siguiente cálculo:

$$\text{IMC} = \text{Peso} / \text{Talla}^2 \text{ (Kg}/\text{m}^2\text{)}$$

Para la valoración del IMC se emplearon los criterios de la SEEDO en su Consenso 2007, tabla 14, para definir la obesidad en grados según su IMC en adultos (Rubio et al., 2007).

Tabla 14. Grados de obesidad según el IMC en adultos

Categoría	Valores Límite del IMC (Kg/m ²)
Peso insuficiente	<18,5
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥50

SEEDO, 2007

3.9.2. RELACIÓN CINTURA-CADERA (CC)

PRINCIPIO:

La relación cintura-cadera da una idea del riesgo que presenta para la salud el grado de obesidad del individuo, en especial, el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, etc.

OBJETIVOS:

Determinar el ICC (índice cintura cadera), para valorar la distribución de la grasa y el riesgo asociado. Una forma simple y de bajo coste, para determinar el fenotipo de la obesidad es la relación cintura-cadera. Esta medida permite caracterizar a los pacientes obesos en androides o tipo manzana, cuando presentan valores superiores a 0,85 en mujeres y 1,0 en hombres. Esta relación cintura-cadera da una idea del riesgo que presenta para la salud el grado de obesidad del individuo, en especial, el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 e hipertensión, que son los riesgos que se asocian a la denominada obesidad androide. Mientras que, en la obesidad denominada ginoide, principalmente, se asocian a litiasis biliar, tromboflebitis e hiperinsulinemia.

MATERIALES:

- Cinta métrica.



Fig.28. Cinta métrica

PROCEDIMIENTO:

La circunferencia de la cintura (cm) fue medida usando una cinta métrica, no elástica, flexible y milimetrada. La toma de medidas se realizó en los puntos anatómicos de referencia con el individuo en bipedestación, en posición erguida, repartiendo el peso equitativamente en ambas piernas y sus brazos relajados a los costados del cuerpo (figura 29). La medida fue tomada al final de una espiración normal, en el punto medio entre la última costilla y el borde superior de la cresta ilíaca, con la cinta ajustada a la piel, pero sin comprimir, manteniéndola de manera paralela al suelo.

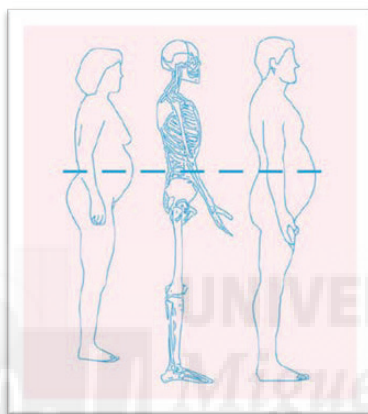


Fig. 29. Referencias anatómicas para determinar la circunferencia de la cintura.

Para la valoración del índice cintura-cadera (ICC) se emplearon los criterios de la SEEDO en su Consenso 2007 como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Riesgo de presentar comorbilidades en función de la circunferencia de la cintura

	Circunferencia de cintura (cm)
Hombre	>102 cm
Mujer	>88 cm

3.9.3. PA: PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA, DIASTÓLICA Y PULSO

PRINCIPIO:

La presión arterial sistólica está relacionada con el riesgo relativo de accidente cerebrovascular y la diastólica como predictor de la cardiopatía coronaria.

Cuanto mayor es el riesgo del hipertenso, más precoz será el objetivo de presión a alcanzar y mantener, y más relevante el control de los FRCV (Factores de Riesgo Cardiovascular) asociados.

El papel del farmacéutico, ante el riesgo cardiovascular del hipertenso, es contribuir a la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular, así como también, a la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular ya establecida. Esta contribución pasa por aconsejar al paciente un cambio de estilo de vida, en el que se encuentre reflejado el cese del hábito tabáquico, la reducción de peso, la menor ingesta de alcohol, el bajo consumo de sal y el de grasas saturadas y grasa total, así como el aumento del consumo de frutas y verduras. La hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y constituye un grave problema sanitario en nuestro país, donde 1 de cada 4 muertes están relacionadas con la elevación de la presión arterial. Un control adecuado de la hipertensión arterial retardaría, considerablemente, la presentación de eventos cardiovasculares, lo que se traduciría en más años de vida y con mejor calidad.

MATERIALES:

- Tensiómetro; OMRON HEALTHCARE EUROPE B.V., i-Q142 (HEM-1040-E)



Fig. 30. Tensiómetro

PROCEDIMIENTO:

Según las normas internacionales establecidas (previo reposo de al menos 5 min del paciente, encontrándose sentado, con la espalda apoyada, las piernas en posición de 90° y el brazo a la altura del corazón) y realizando un promedio de dos tomas separadas por un intervalo de 1 min.

DETERMINACIÓN:

La presión arterial varía según la actividad y la edad, pero un adulto sano en reposo, generalmente, tiene una presión sistólica de 120 mmHg y una presión diastólica de 80 mmHg. El paciente hipertenso, raramente, presenta su enfermedad en forma aislada si no que, generalmente, tiene otros factores de riesgo (colesterol elevado, diabetes, sobrepeso, tabaquismo, sedentarismo), de modo que tienen un riesgo mucho mayor de sufrir una enfermedad del corazón o un accidente cerebrovascular.

Para la valoración de la presión arterial se emplearon los criterios de la Sociedad Española de Hipertensión (Marín et al., 2005) y las condiciones estándar, de acuerdo con las normas vigentes establecidas por la Sociedad Europea de Hipertensión (Guidelines Committee, 2003).

Cifras de PA se consideraron fuera de la normalidad cuando:

- Presión Arterial Sistólica (PAS) > 140 mmHg
- Presión Arterial Diastólica (PAD) >90 mmHg

Además, se ofrecía un servicio personalizado y telefónico de detección precoz y control de hábitos alimentarios, para ayudar a la paciente a obtener una mayor calidad de vida, una óptima educación nutricional y el máximo beneficio de sus medicamentos.

3.9.4. CARACTERÍSTICAS DE LA DIETA RICA EN PESCADO ADMINISTRADA A LAS PARTICIPANTES

Tabla 16. Características de la dieta diaria rica en pescado administrada a las participantes

Energía Total: 1900-2000 kcal	
Proteínas: 12-15% de la energía total	69-70 g
Grasas: 35% de la energía total	78-82 g
	EPA: 0,11-1,35 g
	DHA: 0,11-0,72 g
Colesterol:	<300 g
Carbohidratos: 50-55% de la energía total	262-288 g
Fibra: 15 g/1000 kcal	30 g
Minerales:	Mejora los aportes de K, Ca, Fe, Zn
Vitaminas:	Valores normales
Agua: 1 mL/kcal	2 L/día mínimo

3.10. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON CÁPSULAS OMEGA-3

3.10.1. RESUMEN

El consumo de suplementos dietéticos, a base de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), se está volviendo cada vez más popular en las sociedades occidentales. Las personas con sobrepeso y aquellas con niveles excesivos de colesterol circulante son los principales objetivos de las empresas que comercializan estos productos. En este contexto, estudios recientes han evidenciado una reducción de los TG circulantes tras el consumo de ácidos grasos omega-3, en individuos con diferentes situaciones fisiopatológicas.

Uno de los aspectos que la presente tesis ha estudiado, era determinar si el nivel de oxidación de los ácidos grasos omega-3 comercializados en cápsulas, podría llegar a ser un riesgo para la salud de los consumidores.

3.10.2. OBJETIVOS

El objetivo de esta intervención fue, determinar el efecto del consumo durante 4 semanas de cápsulas omega-3, más y menos oxidadas, sobre el perfil lipídico: colesterol, triglicéridos, glucosa y GPT, en mujeres voluntarias, usuarias habituales de una Oficina de Farmacia.

3.10.3. MÉTODO

3.10.3.1. TIPO DE ESTUDIO: INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON CÁPSULAS OMEGA-3.

Intervención nutricional con cápsulas omega-3 durante 4 semanas, con un diseño aleatorio y controlado a simple ciego en una Oficina de Farmacia de Elche, (Alicante), en el período comprendido de octubre de 2010 a abril de 2011.

3.10.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

Los criterios de selección de las participantes en el estudio fueron los siguientes:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Usuarías que acudieron a la Oficina de Farmacia y que aceptaron participar voluntariamente, firmando el consentimiento informado
- Edades comprendidas entre 25 y 75 años
- Dislipémicas sin indicación de tratamiento farmacológico y con alteraciones lipídicas
- Usuarías con concentraciones elevadas de colesterol (>200 mg/dL) y triglicéridos (>150 mg/dL)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Usuarías en tratamiento con fármacos con influencia sobre el metabolismo lipídico
- Dislipémicas con concentraciones fuera del rango especificado en los criterios de inclusión
- Usuarías con inadecuadas expectativas al cumplimiento y/o colaboración a juicio del investigador

3.10.5. JUSTIFICACIÓN DE LA ELECCIÓN DE LOS CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Algunos de los peligros que pueden derivarse del uso de nutracéuticos enriquecidos en determinados nutrientes, sustancias no nutrientes o concentrados de productos, sería la interacción o influencia que pueden ejercer sobre la eficacia farmacológica de tratamientos de carácter crónico. Los enfermos crónicos suelen tender a complementar su dieta y sus tratamientos farmacológicos con complementos alimenticios, alimentos funcionales o productos fitoquímicos. Por ello, podrían darse interacciones, cuyas consecuencias pueden ser negativas para la evolución y pronóstico de la enfermedad.

No todas las personas pueden incorporar suplementos omega-3 en su dieta sin consultarlo con el médico. Las cápsulas omega-3 pueden tener contraindicaciones cuando se toman medicamentos anticoagulantes, esto se debe a que el omega-3 tiene

efectos anticoagulantes y potenciaría los de la medicación. Aquellas personas que toman aspirina, de forma habitual, podrían tener problemas de hematomas o hemorragias al quedar la sangre demasiado diluida. También, las personas que toman medicamentos para controlar la hipertensión, podrían sufrir bajadas bruscas de la tensión arterial si consumen omega-3 al mismo tiempo que la medicación. Igualmente, los suplementos con omega-3 pueden interactuar con los suplementos de ginkgo biloba, llegando a producir hemorragias. Finalmente, pueden presentar efectos secundarios con la toma de ciertos analgésicos y antiinflamatorios, como el ibuprofeno. Por lo anteriormente expuesto, sólo fueron incluidas en el estudio mujeres sin recibir ningún tratamiento farmacológico.

Los efectos secundarios, más comúnmente observados de la suplementación con ácidos grasos omega-3 son: náuseas, trastornos gastrointestinales y "eructos con regusto de pescado". La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) realizó una revisión exhaustiva, de la seguridad del aceite de pescado en 1997 y concluyó que "los consumidores no deben superar un total de 3 g por día de EPA y DHA, ácidos grasos omega-3", el equivalente de 10 cápsulas de 1g de aceite de pescado (que es el 30% de DHA + EPA), (Lee et al., 2008 y Anand, 2008).

Aunque se han observado períodos prolongados de hemorragias (presentes frecuentemente dentro del rango normal) con dosis muy altas de AGPI omega-3 (20 g/día), una reciente actualización de Harris concluyó que, prácticamente, no se ha observado un incremento en el riesgo de hemorragia, clínicamente significativa, en pacientes con dosis de ácidos grasos omega-3 de hasta 7 g/día de EPA + DHA, incluso cuando se combinan con aspirina o coumadin (warfarina, medicamento anticoagulante) (Harris, 2007). La aparición de cualquiera de las complicaciones mencionadas anteriormente y resumidas en el siguiente listado, se consideraba como criterio de exclusión de la participante durante el estudio:

- **Efectos adversos del consumo de suplementos de omega-3:**
 - Cambios en el sabor de los alimentos
 - Malestar digestivo
 - Eructos
 - Reflujo o acidez

- Náuseas
 - Diarrea
 - Colitis
 - Sarpullidos
 - Dolor de cabeza
- **Efectos severos del consumo de suplementos de omega-3:**
- Sangrado nasal
 - Formación de hematomas
 - Hemorragias
 - Arritmia cardíaca
 - Sensación de opresión o dolor en el pecho

En cuanto a la bioseguridad de los suplementos de ácidos grasos omega-3, se debe indicar un posible aumento de los niveles de LDL-colesterol (normalmente, 5%), pero esto se contrarresta debido a su propiedad de disminuir los triglicéridos desde un 30% a un 50%, (Lavie et al., 1990a, 1987b; Lavie and Milani, 1996; Alaswad et al., 1999). Otro peligro, potencialmente dañino, es el consumo de contaminantes tóxicos, como el metilmercurio, a través de la ingesta de pescado. La FDA ha recomendado que los niños y las mujeres embarazadas o lactantes eviten la caballa, el tiburón y el pez espada, ya que es sabido que suelen tener altos niveles de metales pesados (Consumer Advisory FDA/EPA, 2004).

Afortunadamente, como el mercurio es soluble en agua y está ligado a las proteínas, se localiza, predominantemente, en los tejidos musculares y por lo tanto, no se encuentra en extracciones de aceite de pescado (Foran et al., 2003). Donde se encuentran cantidades insignificantes de mercurio, es en pescados y mariscos ricos en omega-3 que se consumen rutinariamente, incluyendo aquellos tales como camarones, truchas, sardinas, salmones, ostras y arenques (Foran et al., 2004). Estos datos confirman la seguridad del suplemento administrado en forma de cápsulas.

3.10.6. CÁPSULAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

En este estudio se evaluaron los efectos de las cápsulas omega-3 no oxidadas, que se compararon con otras cápsulas omega-3 oxidadas. Ambos productos con un perfil nutricional similar.

Las participantes consumieron 2 cápsulas/día, por lo que su ingesta diaria de nutrientes aportada durante la intervención fue de 600 mg (EPA+DHA).

En la tabla 17 se describe, más detalladamente, la composición nutricional de estos dos suplementos omega-3.

Tabla 17. Composición nutricional de las cápsulas utilizadas en el estudio

	Análisis Nutricional	Por 100g	Por Cápsula	Por 100g	Por Cápsula
	Proteínas	19,68 g	0,14 g	0 g	0 mg
	Ácidos grasos omega-3	50 g	350 mg	100g	1006 mg
LÍPIDOS	Ácido Docosahexaenoico (DHA)	17,86 g	125 mg	-	150 mg
	Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	25 g	175 mg	-	150 mg
	Vitamina E	0,36 g	2,5 mg	-	1 mg
	Valor energético	756 Kcal	5 Kcal	900 Kcal	9,06 Kcal

3.10.7. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Tabla 18: Características demográficas de las participantes

Sexo: Femenino ♀	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Edad (años)	56,65±12,65	56,82±12,18	51,94±10,80
Origen Étnico			
Europa	17	17	15
America del Sur	-	-	3

3.10.8. DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández (UMH), con número de referencia: DBA-EGG-001-12 e identificador del ensayo clínico (Clinicaltrial): NCT01799720. Se midieron los indicadores de riesgo cardiovascular en sangre capilar (indicados previamente) con un medidor de control rápido, Reflotrón® Plus de Roche Diagnostic, con número de serie 5072278 (Barcelona, España).

Las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas por punción capilar, entre las 9:00 y las 11:00 de la mañana, al comienzo del estudio (día 0) y al final del mismo (día 30).

El estudio comenzó con 57 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión (52 llegaron al final del estudio). La asignación de las participantes a los distintos grupos se realizó siguiendo los criterios de clasificación establecidos por (NCEP, 2002) y por el equipo de investigación.

Las participantes fueron asignadas, al azar, a uno de los tres grupos paralelos en relación 1:1:1. El grupo 1 (n=17) tomó 2 cápsulas por día de aceite de pescado omega 3 no oxidado (conteniendo: 300 mg de EPA+DHA por cápsula) y dieta. El grupo 2 (n=17) tomó 2 cápsulas por día de aceite de pescado omega 3 oxidado (conteniendo: 300 mg de EPA+DHA por cápsula) y dieta. Por último, el grupo 3 (n=18) realizó la dieta pero no tomó ningún tipo de cápsula. Por lo tanto, el estudio fue un diseño a simple ciego de

grupos paralelos (en el cual los participantes no sabían qué tipo de cápsulas estaban recibiendo).

Tabla 19. Distribución de las participantes en la intervención nutricional en función del tipo de cápsula consumida

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Nº♀: 17	Nº♀: 17	Nº♀: 18
Cápsula menos oxidada	Cápsula más oxidada	-
(2/día)	(2/día)	-
Dieta	Dieta	Dieta

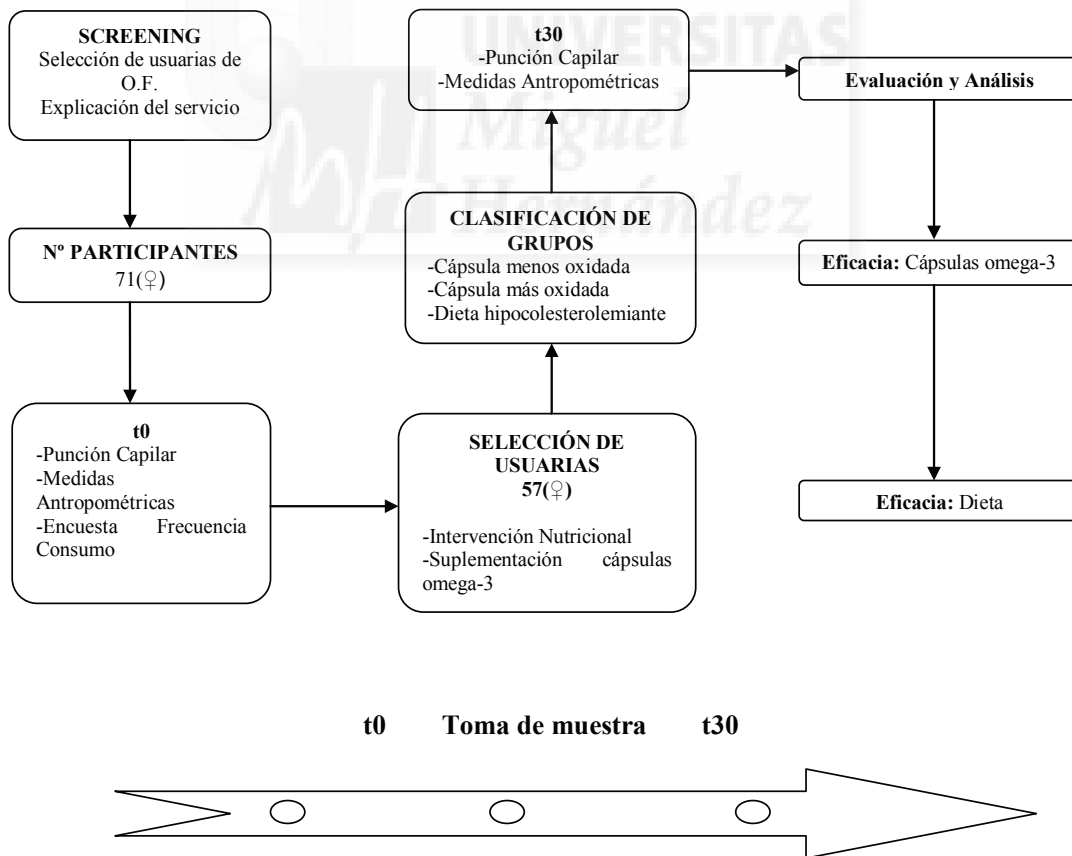


Fig. 31. Esquema del diseño del estudio experimental

3.10.9. DIAGRAMA DE FLUJO

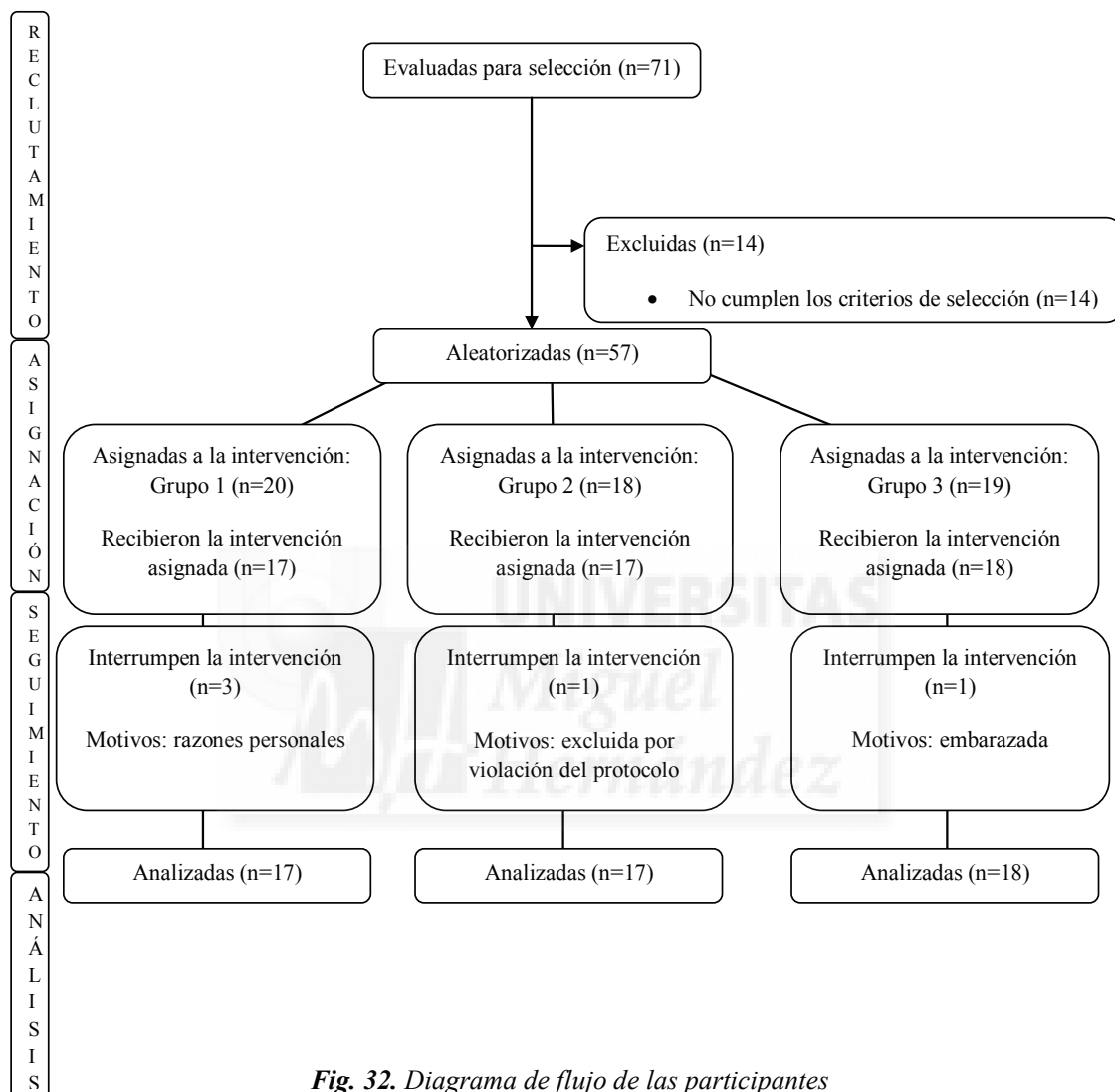


Fig. 32. Diagrama de flujo de las participantes

3.10.9.1. INTERVENCIÓN

Durante el período de intervención de 4 semanas, todas las participantes asistieron a las sesiones de entrenamiento, que tuvieron lugar en la Oficina de Farmacia de manera presencial con el equipo investigador, donde recibieron un manual de instrucciones en el que se especificaba el menú a seguir cada día de la semana, las técnicas de cocción y otros aspectos culinarios más aconsejables a tener en cuenta en la elaboración de los mismos, posibles alimentos equivalentes para sustituir en caso de no

ser del agrado de la participante, así como información relativa a la cantidad de agua que debían consumir diariamente, la realización de actividad física y la importancia de pesarse una vez a la semana, el mismo día y en las mismas condiciones (recién levantadas, en ayuno y con ropa ligera).

El peso corporal (Kg), la altura (cm) y las medidas correspondientes a cintura-cadera (cm) se determinaron según técnicas recomendadas por la OMS (WHO, 1995). Las medidas de presión arterial (mmHg) fueron tomadas bajo condiciones estándar, de acuerdo con las normas vigentes establecidas por la Sociedad Europea de Hipertensión (Guidelines Committee, 2003) y los criterios de la Sociedad Española de Hipertensión (Marín et al., 2005).

El consumo de energía de la dieta diseñada para la hipercolesterolemia fue similar en los tres grupos (1900-2000 kcal por día). La planificación de los menús incluye siete opciones diferentes diarias, la distribución de los macronutrientes así como la ingesta diaria de EPA y DHA de la dieta (tabla 16).

Al inicio de la intervención nutricional, se entregaron a las participantes en la Oficina de Farmacia las cápsulas asignadas a cada uno de los grupos y la dieta rica en pescado. Al final de la misma se recogieron las cápsulas no utilizadas.

Teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión, así como las participantes que no concluyeron el estudio. Finalmente, fueron intervenidas 52 participantes.

3.10.9.2. PROCEDIMIENTO DE REGISTRO DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Todos los acontecimientos o efectos que pudieran tener lugar desde el inicio del tratamiento, fueron registrados en la hoja de recogida de datos (HDR) por el equipo investigador, anotando: fecha de inicio, incidencias durante la intervención, efectos adversos y fecha de fin de intervención. En la tabla 20 se detallan las adversidades ocurridas durante el período de intervención.

Tabla 20. Incidencias y adversidades acontecidas durante el período de intervención

Intervención nutricional con cápsulas omega-3			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Interrumpen la intervención	3	1	1
Motivos	Razones personales	Violación del protocolo	Embarazo
Efectos adversos de la ingesta de cápsulas omega-3	Regusto a pescado	Regusto a pescado	Regusto a pescado Reacciones alérgicas

3.10.9.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Los datos del estudio fueron introducidos por los investigadores en la hoja de recogida de datos (HRD) en papel y, posteriormente, se incorporaron a la base de datos del estudio Microsoft Excel versión 2007.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XV (StarPoint Technologies, Inc. Warrington, VA). Asimismo, la significación se definió en $p < 0,05$. Los datos se expresan como medias \pm error standard de la media (sem). Las comparaciones estadísticas intragrupalas se realizaron mediante las siguientes pruebas de hipótesis, tanto paramétricas como no paramétricas: prueba t, prueba de signo y prueba de rango adaptada para muestras pareadas.

Las comparaciones estadísticas intergrupales se realizaron utilizando el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y las pruebas de hipótesis de Kruskal-Wallis. También, se utilizó la prueba de diferencia mínima (LSD) de Fisher y la HSD de Tukey, para determinar qué medias eran significativamente diferentes de las otras.

La regresión múltiple generalizada se utilizó para analizar estadísticamente las relaciones entre las variaciones en el perfil lipídico y el consumo de complementos dietéticos omega-3.

El interés fue detectar variaciones sensibles en cada una de las variables medidas del perfil lipídico, dentro de cada grupo, después de un mes de seguimiento de la ingesta de suplementos e instrucciones dietéticas. Se consideró un tamaño de efecto grande (Cohen) ($d = 1$), con dos límites mayores del 5% del nivel de significación y una potencia del 80%. Esto permitió obtener un tamaño de muestra de alrededor de 16 mujeres por grupo. Por otro lado, para detectar variaciones sensibles en cada una de las variables estudiadas entre los tres grupos, considerando nuevamente un tamaño de efecto grande (Cohen) ($f = 0,5$), con un nivel de significación del 5% y una potencia del 80%, se obtuvo menos de 17 mujeres por grupo. Esto también se mantuvo para las variables secundarias. El número de voluntarias al final del estudio se ajustó a estos valores calculados teóricamente: $n = 17$ para el grupo 1, $n = 17$ para el grupo 2 y $n = 18$ para el grupo 3.

3.11. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLA DE LINO

3.11.1. RESUMEN

La semilla de lino o linaza, tiene un efecto beneficioso sobre los factores de riesgo cardiovasculares (Dodin et al., 2005), debido a su alto contenido en lignanos, ácido alfa-linolénico y fibra.

Investigaciones recientes sugieren que, los lignanos podrían actuar, positivamente, en el perfil lipídico plasmático modulando enzimas involucradas en el metabolismo del colesterol. Debido a su alto contenido en ácido alfa-linolénico (aproximadamente un 57%), varios estudios demuestran una correlación entre una dieta rica en ácido alfa-linolénico y una reducción en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Cunnane et al., 1995). Un reciente metaanálisis apoyó la idea de que el consumo de semilla de lino podría reducir los niveles elevados de colesterol circulante en las mujeres.

3.11.2. OBJETIVOS

El objetivo de esta intervención fue determinar el efecto del consumo, durante 4 semanas, de 15 g de semilla de lino sobre el perfil lipídico: colesterol, colesterol-HDL, triglicéridos y glucosa en mujeres voluntarias, usuarias habituales de una Oficina de Farmacia.

3.11.3. MÉTODO

3.11.3.1. TIPO DE ESTUDIO: INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLAS DE LINO

Intervención nutricional con semillas de lino durante 4 semanas, con un diseño paralelo, aleatorizado y controlado a simple ciego en una Oficina de Farmacia de Elche, (Alicante), en el período comprendido de noviembre de 2012 a abril de 2013.

3.11.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

Los criterios de selección de las participantes en el estudio fueron los siguientes:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Usuaris que acudieron a la Oficina de Farmacia y que aceptaron participar voluntariamente, firmando el consentimiento informado
- Edades comprendidas entre 25 y 75 años
- Dislipémicas sin indicación de tratamiento farmacológico y con alteraciones lipídicas
- Usuaris con concentraciones elevadas de colesterol (>200 mg/dL)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Usuaris en tratamiento con fármacos con influencia sobre el metabolismo lipídico
- Dislipémicas con concentraciones fuera del rango especificado en los criterios de inclusión
- Usuaris con inadecuadas expectativas al cumplimiento y/o colaboración a juicio del investigador

3.11.5. SEMILLA DE LINO UTILIZADA EN EL ESTUDIO

- En este estudio se evaluó el efecto que el consumo diario de dos cucharadas soperas de semilla de lino, equivalentes a 15 g con yogur desnatado (125 g) durante 4 semanas, afecta a la sintomatología de perfil lipídico.
- Las participantes consumieron 2 cucharadas soperas 15 g/día en yogur desnatado (125 g)
- En la tabla 21 se describe, más detalladamente, la composición nutricional de la semilla de lino:

Tabla 21. Composición nutricional de la semilla de lino en el estudio

SEMILLA DE LINO	
Análisis Nutricional	Semillas Lino Dorado
Ingredientes	Lino dorado (100%) *Procedente de agricultura ecológica Elaborado en una fábrica que utiliza soja, cereales con gluten, frutos secos de cáscara, derivados lácteos, huevos, sésamo y apio
Conservar en lugar fresco y seco en verano en la nevera	



Fig. 33. Aporte de semilla de lino en yogur



3.11.6. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Tabla 22. Características demográficas de las participantes

Sexo: Femenino ♀	Grupo 1	Grupo 2
Edad (años)	54,60±10,06	58,09±9,41
	Origen Étnico	
Europa	28	31
África	1	1
Sudamérica	1	0

3.11.7. DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO

Las usuarias seleccionadas (n=64) que aceptaron participar voluntariamente en el estudio, firmaron un consentimiento informado por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), con número de referencia: IB-EGG-01-13. Se midieron los indicadores de riesgo cardiovascular tales como glucosa, colesterol, colesterol-HDL y triglicéridos en sangre capilar, con un medidor de control rápido, Reflotrón® Plus de Roche Diagnostic, con número de serie 5072278 (Barcelona, España).

Las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas, por punción capilar, entre las 9:00 y las 11:00 de la mañana, al comienzo del estudio (día 0) y al final del mismo (día 30). Conformada por 64 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión (48 llegaron al final del estudio). La asignación de las participantes a los distintos grupos, se realizó siguiendo los criterios de clasificación establecidos por (NCEP, 2002) y por el equipo de investigación.

Las participantes fueron asignadas, al azar, a uno de los dos grupos paralelos en relación 1:1. El grupo 1 (n=32) tomó 2 cucharadas soperas de semillas de lino (15 g) con yogur desnatado a media mañana y dieta. El grupo 2 (n=32) tomó yogur desnatado a media mañana y dieta.

Tabla 23. Distribución de las usuarias participantes en la intervención nutricional que han consumido semillas de lino

Grupo 1	Grupo 2
Nº♀: 30	Nº♀: 32
Semilla de lino + Yogur Desnatado (2 cucharadas soperas (15 g)/día)	Yogur Desnatado
Dieta	- Dieta

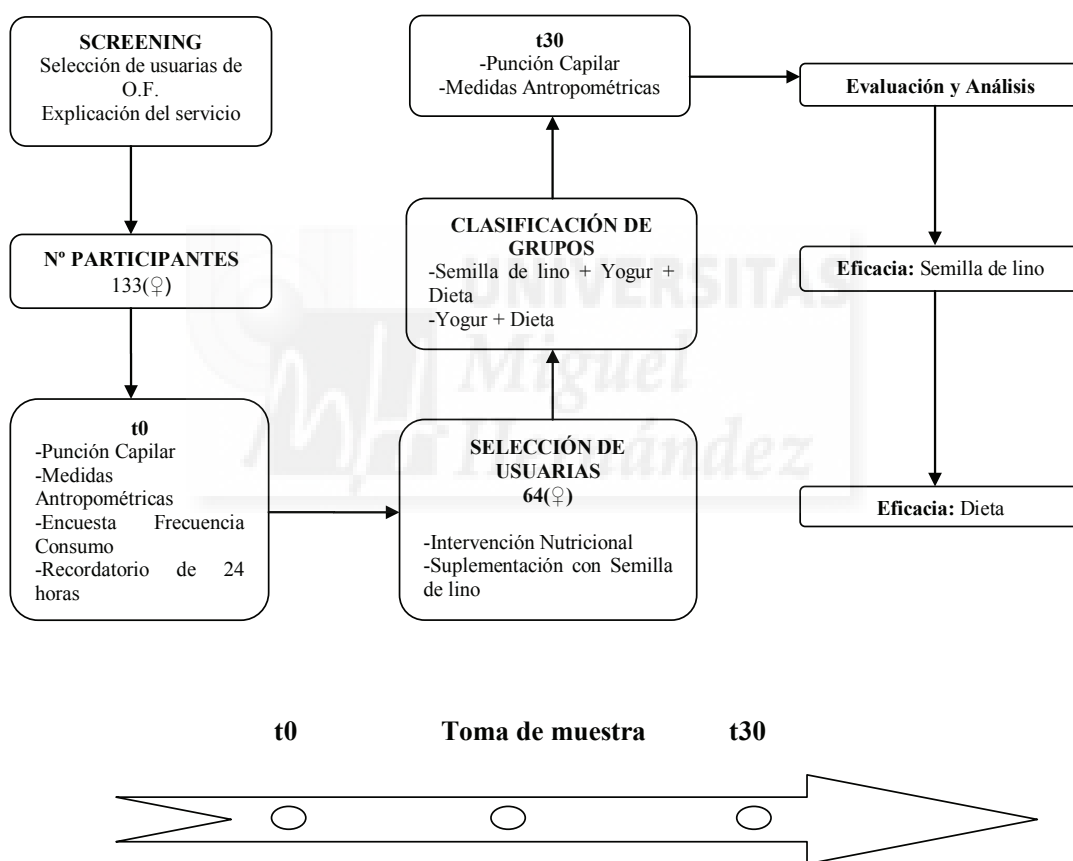


Fig. 34. Esquema del diseño del estudio experimental

3.11.8. DIAGRAMA DE FLUJO

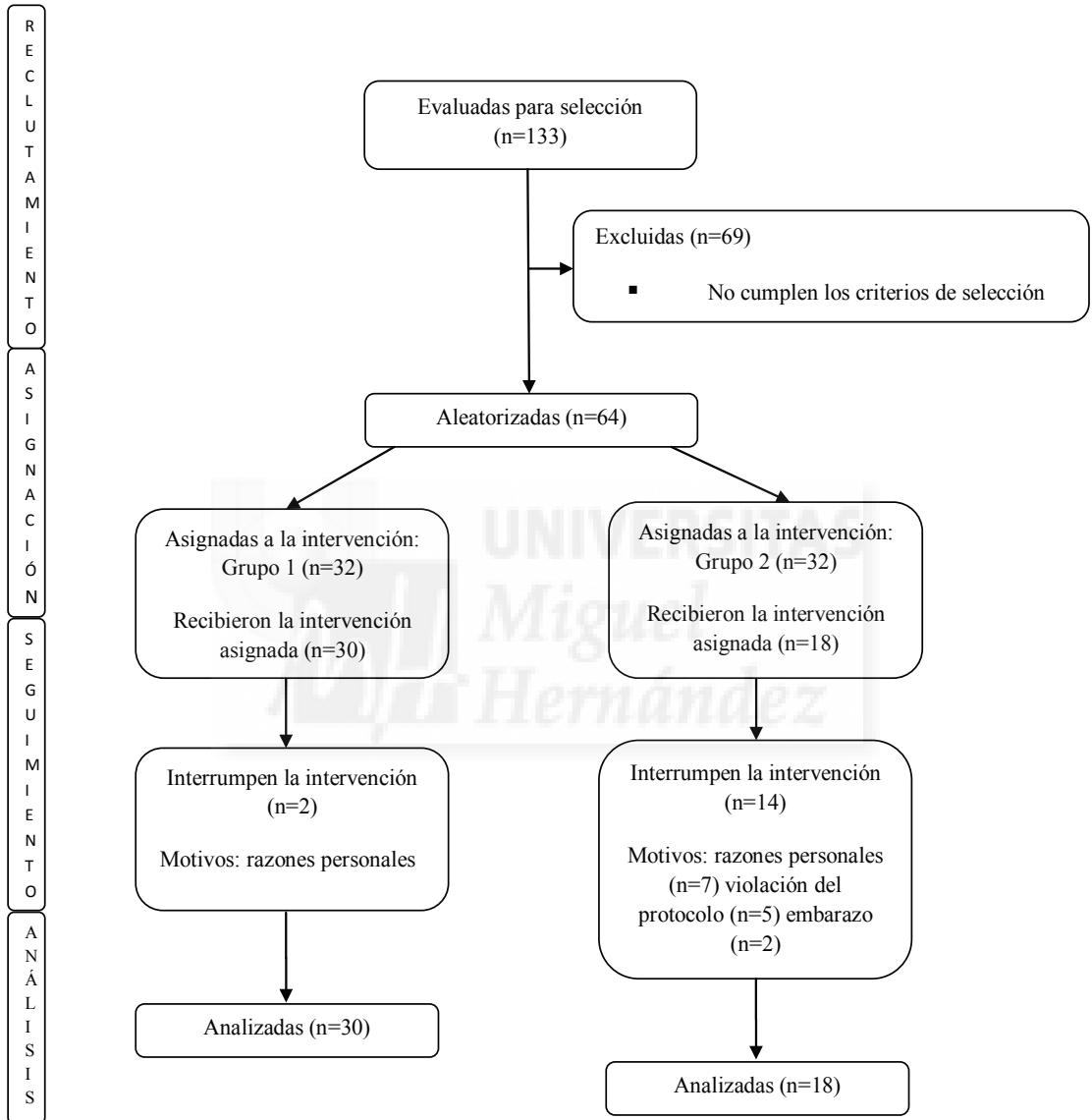


Fig. 35. Diagrama de flujo de las participantes

3.11.9. INTERVENCIÓN

Durante el período de intervención de 4 semanas se siguieron las mismas instrucciones, comentadas anteriormente. Todas las participantes recibieron una bolsa de semilla de lino (500 g) asignada al grupo correspondiente y una dieta rica en pescado. El consumo de energía de la dieta diseñada para la hipercolesterolemia fue similar en los grupos (1900-2000 kcal por día). La planificación de los menús incluyó siete opciones diferentes diarias, la distribución de los macronutrientes, así como la ingesta diaria de EPA y DHA de la dieta (tabla 16). Al final de la misma se recogieron las bolsas de semilla de lino no utilizadas.

3.11.9.1. PROCEDIMIENTO DE REGISTRO DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Todos los acontecimientos o efectos que pudieran tener lugar desde el inicio del tratamiento, fueron registrados en la hoja de recogida de datos (HDR) por el equipo investigador, anotando: fecha de comienzo, incidencias durante la intervención, efectos adversos y fecha de fin de intervención. En la tabla 24 se detallan las adversidades ocurridas durante el período de intervención.

Tabla 24. Incidencias y adversidades acontecidas durante el período de intervención

Intervención nutricional con semilla de lino		
	Grupo 1	Grupo 2
Interrumpen la intervención	2	14
Motivos	Razones personales	Razones personales Violación del protocolo Embarazo
Efectos adversos de la ingesta de semilla de lino	-	Reacciones alérgicas

3.11.9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Los datos del estudio fueron introducidos por los investigadores en la hoja de recogida de datos (HRD) en papel y, posteriormente, se incorporaron a la base de datos del estudio Microsoft Excel versión 2007.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc. Warrington, VA, EE.UU.). Asimismo, la significación se definió en $p < 0,05$. Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (sem). La homogeneidad entre las condiciones iniciales de glucosa, colesterol, peso, presión sistólica y presión diastólica, de ambos grupos, se realizó mediante las siguientes pruebas paramétricas y no paramétricas: prueba t, prueba W y prueba KS. La primera, para la diferencia de las medias, la segunda, para la diferencia de las medianas y la tercera, para la diferencia de las distribuciones. Las comparaciones estadísticas intragrupo se realizaron mediante las siguientes pruebas de hipótesis, tanto paramétricas como no paramétricas: prueba t, prueba de signo y prueba de rango adaptada para muestras pareadas.

Los grupos 1 y 2 presentaron, al comienzo del estudio, niveles de colesterol total superiores a los límites sanos (>200 mg/dL). En este diseño, el grupo 2 fue considerado como el control del grupo 1, ya que siguió la misma dieta con la única diferencia que, la semilla de lino se omitió en el yogur desnatado ingerido en el desayuno.

Las condiciones iniciales de ambos grupos, no fueron significativamente diferentes, excepto para la glucosa ($p < 0,03$ para las tres pruebas estadísticas), para las otras variables estudiadas se obtuvieron los siguientes resultados: colesterol ($p > 0,30$, para las tres pruebas estadísticas), triglicéridos ($p > 0,30$ para las tres pruebas estadísticas), peso ($p > 0,10$ para las tres pruebas estadísticas), presión sistólica ($p > 0,80$ para las tres pruebas estadísticas) y diastólica ($p > 0,30$, para las tres pruebas estadísticas). Por lo tanto, podemos considerar que el punto de partida de ambos grupos fue homogéneo.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD: OXIDACIÓN DE ACEITES DE PESCADO RICOS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 ADMINISTRADOS EN FORMA DE CÁPSULAS

La oxidación lipídica es un complejo proceso degradativo que transcurre a través de la formación de numerosas especies reactivas, entre las que se encuentran los radicales lipídicos, los peróxidos lipídicos y productos finales del proceso degradativo como el malondialdehído (MDA) y otros aldehídos tóxicos. Estos compuestos, principalmente el MDA, y otras especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARs), forman aductos con el ADN por lo que se comportan como potenciales mutágenos y carcinógenos. Además, afectan negativamente a membranas celulares y oxidan aminoácidos presentes en las proteínas. En las primeras etapas del envejecimiento oxidativo se producen diversos peróxidos que modifican las propiedades sensoriales de la grasa, por lo que la prueba del índice de peróxidos sólo es representativa en esta primera fase. En cambio, la determinación de TBARs (como el MDA) refleja estadios finales del proceso de degradación lipídica.

Los resultados de este estudio muestran que el estado oxidativo de los complementos alimenticios comercializados a base de pescado, difieren en gran medida. Según los resultados, los altos niveles de peróxidos detectados en algunos de estos nutraceuticos comerciales pueden minimizar la eficacia, e incluso, los beneficios que se les atribuyen.

Los parámetros utilizados para determinar el grado de oxidación de nutraceuticos conteniendo aceites ricos en ácidos grasos omega-3 son: el índice de peróxidos, la determinación de TBARs y los valores del coeficiente de extinción al ultravioleta K_{232} , K_{270} y K_{280} (ver Materiales y Métodos).

Los datos indican que el índice de peróxidos podría ser el índice más exacto para evaluar la oxidación del aceite. Todas las marcas presentaron un índice de peróxidos muy similar después de 6 meses, en comparación con el tiempo 0, lo que indicaba que la calidad del producto inicial (materia prima antes de encapsular) fue determinante en la oxidación de aceites encapsulados. Esta observación puede explicarse por el uso de antioxidantes en el momento de la encapsulación. Algunas de las marcas indicaban la adición de vitamina E (con valores entre 0,5 mg a 19,8 mg por cápsula) y otras,

concretamente 5 marcas, adicionaron vitamina A (desde 0,005 mg hasta 2,5 mg por cápsula) y vitamina D (entre 0,0033 mg y 0,2 mg por cápsula), aunque ésta última no tiene propiedades antioxidantes, por lo que se adicionaba con vitamina A en las marcas en las que estaba presente.

A continuación, en la tabla 25 se muestran los contenidos declarados de antioxidantes en cada una de las marcas comerciales.

Tabla 25. Antioxidantes declarados por cápsula en las distintas marcas comerciales

Antioxidantes añadidos		
Muestras	Vitamina E (mg)	Vitamina A (mg)
1	n.i.c.	n.i.c.
2	n.i.c.	0,375
3	6,7	n.i.c.
4	2,5	n.i.c.
5	5	n.i.c.
6	0,55	n.i.c.
7	n.i.c.	0,8
8	n.i.c.	0,375
9	n.i.c.	1,5
10	0,5	2,5
11	1	n.i.c.
12	10	n.i.c.
13	19,8	0,005
14	1,55	n.i.c.
15	n.i.c.	n.i.c.
16	3	n.i.c.

n.i.c.: no indica contenido

Para conocer qué marcas presentaron un índice de peróxidos estadísticamente superior, se realizó un análisis de varianza/test de medias de Scheffe mediante el software Statistic 8.0 para Windows (Analytical Software, NY, USA) (ver Tabla 27).

4.1.1 VALORES DE EPA Y DHA DE LAS DISTINTAS MARCAS ANALIZADAS

En la tabla 26 se muestra el contenido de EPA + DHA de las 16 marcas de complementos alimenticios a base de aceite de pescado analizadas. En el estudio, el contenido de EPA + DHA varió mucho entre diferentes marcas y en algunos de estos productos, concretamente las marcas 3, 5, 7, 9, 10 y 15 no indicaron la información correspondiente a la cantidad de ácidos grasos omega-3 presentes en las cápsulas.

Tabla 26. Valores de EPA + DHA por cápsula según indicación del fabricante para las marcas analizadas

Marca	EPA +DHA (mg)
1	105 + 75
2	32 + 49
3	-
4	175 + 125
5	-
6	30 + 35
7	-
8	34 + 32
9	-
10	-
11	180 + 120
12	357 + 143
13	11,3 + 6,1
14	21 + 14
15	-
16	90 + 60

4.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS Y DEL NIVEL DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARs) EN ACEITES DE PESCADO RICOS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Para determinar la calidad de las muestras y el grado de oxidación de los aceites comerciales conteniendo ácidos grasos omega-3, se determinó el índice de peróxidos y el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs).

En la tabla 27 se muestran los valores medios y desviaciones típicas de los índices de peróxidos y del nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) de las 16 marcas estudiadas. Respecto al índice de peróxidos determinado en las

cápsulas, se observaron 3 grupos con índices de peróxidos significativamente diferentes ($p < 0,05$). El primer grupo incluyó las marcas con los valores más bajos de índice de peróxidos (420 meq/kg de aceite) correspondiente a las marcas 2, 4 y 15. El segundo grupo estaba constituido por las marcas que presentan los mayores valores de índice de peróxidos (575 meq/kg de aceite), correspondientes a las marcas 10 y 13. El resto de marcas presentaban niveles intermedios de peróxidos, concretamente, los comprendidos entre la marca 6 (27,48 meq/kg de aceite) y marca 11 (47,67 meq/kg de aceite).

Respecto al nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), la mayoría de las muestras estudiadas mostraron valores relativamente bajos de TBARs, a excepción de las muestras 4, 5, 11 y 13, que mostraron valores altos.

Tabla 27. Valores medios y desviaciones típicas de los índices de peróxidos (media \pm sem) y TBARs para las diferentes marcas analizadas. Análisis de varianza (Tukey HSD)

MARCA	Índice de peróxidos (meq/kg aceite)	TBARs ([MDA] μ M)
1	38,12 \pm 1,44 ^d	5,41 \pm 1,45 ^c
2	16,98 \pm 1,94 ^f	3,64 \pm 1,25 ^c
3	40,79 \pm 2,39 ^d	9,66 \pm 1,63 ^c
4	15,10 \pm 1,02 ^f	39,80 \pm 3,33 ^{ab}
5	27,76 \pm 0,07 ^e	43,49 \pm 7,54 ^a
6	27,48 \pm 0,32 ^e	4,47 \pm 2,69 ^c
7	28,83 \pm 1,30 ^e	6,57 \pm 1,60 ^c
8	46,90 \pm 1,36 ^c	7,52 \pm 1,38 ^c
9	47,21 \pm 0,59 ^c	1,20 \pm 0,90 ^c
10	93,21 \pm 3,08 ^a	3,80 \pm 0,66 ^c
11	47,67 \pm 0,08 ^c	31,37 \pm 6,08 ^b
12	40,95 \pm 2,43 ^d	6,09 \pm 1,75 ^c
13	78,97 \pm 0,70 ^b	13,29 \pm 3,59 ^c
14	38,62 \pm 0,19 ^d	n.d*
15	19,69 \pm 0,81 ^f	n.d*
16	39,17 \pm 0,51 ^d	n.d*

n.d.: no detectado. Superíndices distintos implican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)*

Los resultados obtenidos de TBARs e índice de peróxidos muestran que, el estado oxidativo de los complementos alimenticios comercializados a base de aceites de pescado, difieren en gran medida de unas muestras a otras.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA MEDIDA ESPECTOFOTOMÉTRICA DE LA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN UV K_{232} , K_{270} y K_{280} EN ACEITES DE PESCADO RICOS EN ÁCIDOS OMEGA-3

Continuando con las medidas de calidad de las muestras y el grado de oxidación de las cápsulas conteniendo ácidos grasos omega-3, se determinó por espectrofotometría la absorción en la región ultravioleta UV, K_{232} , K_{270} y K_{280} .

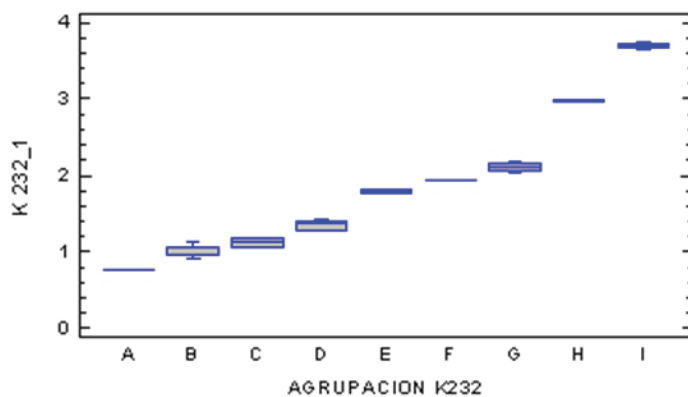
En la tabla 28 se muestran los subgrupos en los que se han agrupado las distintas marcas comerciales.

Tabla 28. Subgrupos Ks en los que se han agrupado las distintas marcas comerciales de cápsulas de aceite de pescado

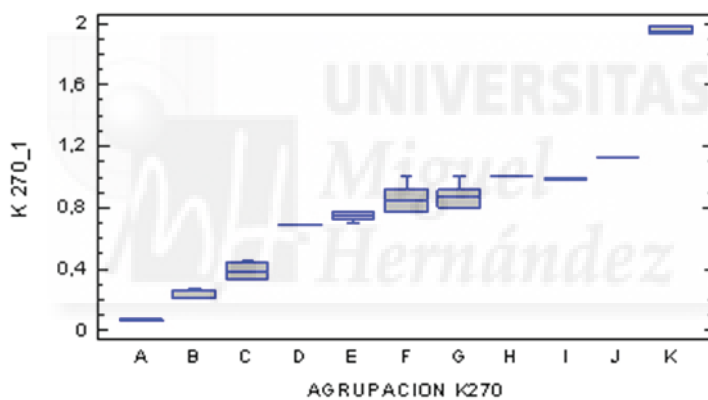
MARCA	K_{232}	K_{270}	K_{280}
1	F	I	H
2	D	E-F	F-G
3	C	B	B
4	G	C	C
5	G	B	B
6	A	A	A
7	B	B	B
8	E	H	H
9	D	F-G	H
10	H	J	I
11	E	G	G
12	I	D	E
13	G	C	D
14	I	K	J
15	B	C	C-D
16	G	E	E-F

F, D, C, G, A, B, E, D, H, I, J, K: diferentes grupos ordenados de menor a mayor coeficiente de extinción molar, aplicando el test de diferencias de medias. Las muestras que pertenecen al mismo grupo presentan valores de K similares.

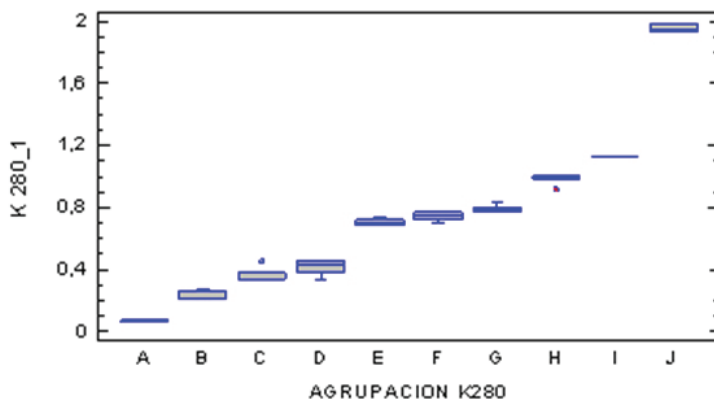
El coeficiente de extinción molar K_{232} corresponde a la presencia de hidroperóxidos conjugados (oxidación lipídica de los subproductos iniciales) y se relaciona mayoritariamente, pero no necesariamente, con el índice de peróxidos determinado anteriormente. K_{270} y K_{280} indican la presencia de pentanal, hexanal, hidroxinonanal y malondialdehído (fases terminales de la oxidación lipídica) en las correspondientes muestras de aceites. La determinación de K_{232} permitió separar las 16 marcas comerciales de aceite omega-3 en nueve grupos (figura 36 (A)), 11 grupos para K_{270} (figura 36 (B)) y 10 grupos para K_{280} (figura 36 (C)) (ver figura 36).



A



B



C

Fig. 36 (A, B, C). Gráficos de caja y bigotes para los tres coeficientes de extinción molares (K_s) medidos en el total de muestras analizadas: K_{232} (A), K_{270} (B) y K_{280} (C)

4.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN SEMILLA DE LINO

La extracción de aceite de las semillas de lino es, básicamente, un procedimiento de transferencia de masa y depende de parámetros clave, como la elección del método de extracción más apropiado, el tipo de disolvente a utilizar, así como la naturaleza de la muestra a extraer. La selección de disolventes utilizados se debe, principalmente, a su polaridad y afinidad por los componentes lipídicos. Una de las desventajas del uso de disolventes en estos métodos de extracción, es que existen restricciones legales sobre los residuos máximos que pueden quedar en los aceites, especialmente, cuando los aceites son la materia prima para la producción de alimentos o productos nutracéuticos. Estos límites se basan en la legislación vigente y pueden variar en el futuro, pero siempre hacia contenidos más bajos para garantizar la seguridad de los consumidores. Además, se cree que la exposición prolongada de las muestras de lino a los disolventes puede causar la oxidación de sus ácidos grasos (Singh, 2011).

Las tablas 29 - 34 muestran los resultados del porcentaje de aceite obtenido de muestras de diferentes marcas de semilla de lino. Cada tabla resume los resultados obtenidos para cada ensayo y su réplica, indicando el método aplicado y la muestra de

lino utilizada. Además, las tablas proporcionan parámetros estadísticos relevantes, tales como, el valor medio, su desviación estándar, así como los valores superior e inferior obtenidos en cada prueba.

4.4.1. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO SOXHLET

Tabla 29. Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método soxhlet usando éter de petróleo

MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET			
Solvente: Éter de Petróleo			
Muestras (20 g)	% aceite	Réplicas	% aceite
1	36,5	1-1	53
2	31,2	2-1	30,6
3	41,45	3-1	38,7
4	46	4-1	37,45
5	40,9	5-1	36
6	40	6-1	38,85
7	35,4	7-1	36,55
8	11,35	8-1	11,8
9	48,05	9-1	45,05
Promedio	36,76		36,44
Desv. estándar	10,85		11,19
Rango superior	48,05		53,00
Rango inferior	11,35		11,8

Tabla 30. Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método soxhlet usando éter dietílico

MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET			
Solvente: Éter dietílico			
Muestras (20 g)	% aceite	Réplicas	% aceite
1	38,5	1-1	41,5
2	42,25	2-1	33,75
3	44,1	3-1	43,75
4	41,45	4-1	44,65
5	41,2	5-1	43,05
6	45,75	6-1	45,55
7	42,8	7-1	40,15
8	15,8	8-1	15,45
9	44	9-1	49
Promedio	39,54		39,65
Desv. estándar	9,14		10,00
Rango superior	45,75		49
Rango inferior	15,8		15,45

Tabla 31. Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método soxhlet usando n-hexano

MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET			
Solvente: N-Hexano			
Muestras (20 g)	% aceite	Réplicas	% aceite
1	25,7	1-1	35,75
2	29	2-1	30,55
3	37,75	3-1	38,1
4	24,5	4-1	15,7
5	40,35	5-1	45,3
6	50,6	6-1	42,35
7	36,8	7-1	41,9
8	14,75	8-1	14,1
9	50,2	9-1	49,6
Promedio	34,41		33,98
Desv. estándar	12,01		12,55
Rango superior	50,60		49,6
Rango inferior	14,75		14,1

4.4.2. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO ULTRASONIDOS

Tabla 32. Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método ultrasonidos utilizando éter de petróleo

MÉTODO DE EXTRACCIÓN ULTRASONIDOS			
Solvente: Éter de Petróleo			
Muestras (20 g)	% aceite	Réplicas	% aceite
1	16,9	1-1	26,6
2	17,7	2-1	32,2
3	19,6	3-1	23,8
4	23,4	4-1	30,6
5	20,3	5-1	27,8
6	20,6	6-1	27,5
7	19,9	7-1	22,3
8	7,7	8-1	10,4
9	16,9	9-1	24,7
Promedio	18,11		25,10
Desv. estándar	4,41		6,34
Rango superior	23,4		32,2
Rango inferior	7,7		10,4

Tabla 33. Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método ultrasonidos utilizando éter dietílico

MÉTODO DE EXTRACCIÓN ULTRASONIDOS			
Solvente: Éter Dietílico			
Muestras (20 g)	% aceite	Réplicas	% aceite
1	21,3	1-1	18,3
2	20,4	2-1	14,8
3	15,4	3-1	18,1
4	24,2	4-1	21,4
5	24,1	5-1	20,6
6	21,8	6-1	19,5
7	25,7	7-1	18,8
8	7,8	8-1	6,1
9	26,5	9-1	23,3
Promedio	20,80		17,88
Desv. estándar	5,90		5,01
Rango superior	26,5		23,3
Rango inferior	7,8		6,1

Tabla 34. Rendimiento del aceite (%) obtenido después de la extracción por el método ultrasonidos utilizando n-hexano

MÉTODO DE EXTRACCIÓN ULTRASONIDOS			
Solvente: N-Hexano			
Muestras (20 g)	% aceite	Réplicas	% aceite
1	23,2	1-1	16,7
2	25,2	2-1	14,1
3	24,7	3-1	13
4	24,5	4-1	17,4
5	21	5-1	16,9
6	24,1	6-1	15,6
7	25,5	7-1	13,9
8	10,7	8-1	5,7
9	28,1	9-1	21,1
Promedio	23,00		14,93
Desv. estándar	4,98		4,22
Rango superior	28,1		21,1
Rango inferior	10,7		5,7

La eficacia de la extracción depende de varios factores: el método de extracción utilizado, el disolvente y el contenido de aceite en las distintas muestras de semillas. Con respecto al método de extracción, los datos de las tablas 29 - 31 muestran que se obtuvieron porcentajes elevados de aceite mediante el método soxhlet cuando se utilizaron los 3 disolventes ensayados (36,6% con éter de petróleo, 39,6% con éter dietílico y 34,2% con n-hexano). Los datos de las tablas 32-34 indican que se extrajeron porcentajes menores de aceite mediante el método de ultrasonidos utilizando los 3 disolventes ensayados (21,6% con éter de petróleo, 19,3% con éter dietílico y 19,0% con n-hexano).

En cuanto a las marcas, la muestra 9 (semilla de lino dorada molida) presentó los valores de mayor rendimiento al utilizar el método soxhlet, llegando hasta el 49,0% (tablas 30 y 31).

Un resumen de los rendimientos del aceite obtenidos durante la extracción con los diferentes disolventes se muestra en la figura 37.

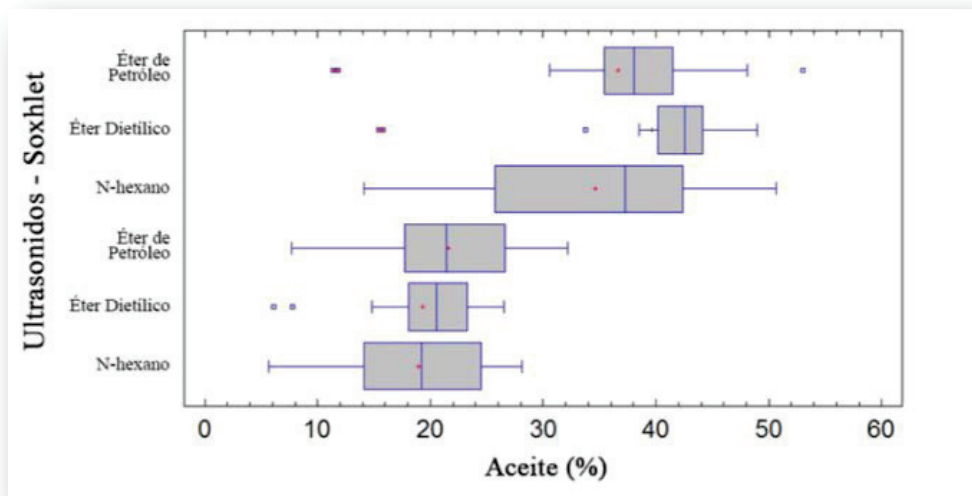


Fig. 37. Gráfico de caja y bigotes representando el porcentaje del contenido de grasa afectado por el método de extracción (soxhlet o ultrasonidos) y el disolvente (éter de petróleo, éter dietílico y n-hexano)

Los porcentajes de aceite de lino extraídos variaron del 6,1% (utilizando ultrasonidos con éter dietílico como disolvente en la marca comercial 8) a 53,0% (utilizando el método soxhlet con éter de petróleo como disolvente en la marca 1). También se puede observar que el método, independientemente del disolvente utilizado, es el factor más influyente en cuanto a la eficiencia de extracción. Por lo tanto, el método soxhlet proporcionó mayores rendimientos que el método ultrasonidos para los tres disolventes. En particular, el porcentaje medio de aceite extraído por el método soxhlet, 36,9%, fue casi el doble que el obtenido por el método ultrasonidos, 20,0%. Los intervalos del método soxhlet se situaron entre el valor más alto obtenido con la marca 1 utilizando éter de petróleo y el valor más bajo con la marca 8 utilizando el mismo disolvente (tabla 29).

La tabla 36 resume los resultados de ANOVA para los 3 factores bajo análisis (método de extracción, disolvente y marca comercial). Este análisis muestra que el método y la marca comercial tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de aceite de lino extraído ($p < 0,001$), mientras que la elección del disolvente no afecta significativamente los valores (ver tabla 36).

Finalmente, también se deben tener en cuenta otros parámetros, como la calidad del aceite obtenido, el comportamiento del disolvente utilizado para la extracción y el

uso final del aceite. La calidad del aceite final puede evaluarse determinando la composición de ácidos grasos y los niveles de oxidación (ver más adelante). En cuanto al comportamiento del disolvente y su uso final, el tipo de disolvente, la toxicidad y los medios utilizados para la eliminación, son factores instrumentales a considerar.

Tabla 35. ANOVA (%) aceite extraído según el método de extracción

Fuente	Suma cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	7768,19	1	7768,19	103,22	0,0000
Sin grupos	7977,79	106	75,26		
Total (Corr.)	15746,0	107			

Corr.: corregido

Tabla 36. Análisis de varianza multifactorial para el modelo de tres factores

Análisis de varianza para el (%) de aceite - Tipo III Suma de cuadrados

Fuente	Suma cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados	F-Ratio*	P-Valor
Principales efectos					
A: marca comercial	4700,13	8	587,52	18,05	0,00
B: método	7768,19	1	7768,19	238,60	0,00
C: solvente	152,21	2	76,11	2,34	0,10
RESIDUAL	3125,45	96	32,56		
TOTAL (Corregido)	15746,0	107			

*Todos los F-ratios se basan en el error cuadrático medio residual

Tabla 37. ANOVA (%) aceite extraído según las distintas marcas comerciales

Fuente	Suma cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	4700,13	8	587,52	5,27	0,0000
Sin grupos	11045,80	99	111,57		
Total (Corr.)	15746,0	107			

Corr.: corregido

Del mismo modo, el factor que más contribuyó y que explicó el 49,3% de la variación total del porcentaje de aceite extraído, fue el método utilizado, seguido por la marca comercial 29,8%. Por tanto, el tipo de disolvente no contribuyó a las variaciones en los porcentajes de aceite extraído.

El análisis de varianza unidireccional (tabla 36) y la prueba de Kruskal-Wallis para el factor marca comercial, mostraron diferencias estadísticamente significativas (tanto en medias como en medianas) entre las marcas registradas al extraer aceite de lino ($p < 0,001$ en ambos casos).

Después de analizar las pruebas de rango múltiple (tanto para los datos originales como para los datos transformados usando la función de rango) y aplicando el procedimiento de LSD al 95%, se observó que las 9 marcas comerciales podrían clasificarse en orden creciente según el porcentaje medio del aceite de lino extraído, quedando del siguiente modo: $8 < 2 \leq 4 \approx 1 \approx 3 \approx 5 \approx 7 \approx 6 \leq 9$. Por lo tanto, la marca comercial es un factor a tener en cuenta al analizar la cantidad de aceite extraído de la semilla de lino.

4.4.3. METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE LA SEMILLA DE LINO

En la fracción lipídica de las muestras analizadas de semilla de lino, se identificaron ácidos grasos de todas las familias: **saturados, monoinsaturados-cis y poliinsaturados omega-3/omega-6**. Éstos se identificaron y cuantificaron mediante el análisis de los perfiles cromatográficos obtenidos (figura 38). Los resultados evidenciaron que las muestras analizadas de semilla de lino tienen un porcentaje de ácidos grasos linoleico y γ -linolénico mayor que el aceite de oliva (15,23% y 65,52%, respectivamente) y, por tanto, una concentración menor de ácidos grasos saturados. Existen diferencias y similitudes en lo que se refiere al contenido de ácidos grasos saturados e insaturados, con referencia a la semilla dorada, semilla marrón y semilla triturada de partida.

El perfil de los ácidos grasos, mostró, claramente, el predominio de los ácidos linolénico y linoleico, que representaron ~ 80% del total de ácidos grasos (tabla 38). El ácido graso más abundante fue el ácido linolénico con un 65,52% y el ácido linoleico con un 15,23%. La abundancia de los ácidos grasos se distribuyó según el orden siguiente: C18:3 (ácido linolénico) > C18:1 (ácido oleico) > C18:2 (ácido linoleico) > C16:0 (ácido palmítico) > C18:0 (ácido esteárico) > C22:0 (ácido docosanoico) > C20:0 (ácido eicosanoico) > C16:1 (ácido palmitoleico) > C14:0 (ácido mirístico) > C15:0 (ácido pentadecanoico).

La composición de ácidos grasos difiere de unas muestras a otras, dependiendo de la zona donde hayan sido cultivadas las plantas de lino. Algunos de los factores principales que afectarían a la composición en ácidos grasos de las distintas semillas de lino, serían las condiciones climáticas, la variedad y la latitud.

Por otro lado, la concentración de ácido oleico, importante ácido graso monoinsaturado desde el punto de vista nutricional, es más alta en la muestra número 2 (35,87%) seguida de la muestra número 6 (18,26%), y la muestra número 7 (8,28%), en todos los casos no supera la del aceite de oliva 71,9%.

De las distintas muestras analizadas en este estudio, se puede observar que la muestra 2 presenta un 15,23% de ácido linoleico, seguida de la muestra 7 cuya concentración es del 12,73% y de la muestra 8 con una concentración del 11,73%. Cabe destacar que, la muestra 2 es semilla de lino dorada, la muestra 7 es mezcla de semilla

de lino dorada y marrón triturada, y la muestra 8 es semilla de lino molida. A pesar de las diferencias de formato existentes entre las muestras 7 y 8 presentan valores muy similares para el ácido graso linoleico.

El ácido graso γ -linolénico, sin embargo, es el que mayor concentración presenta respecto al resto de ácidos grasos en todas las muestras analizadas, concretamente la concentración que presenta la muestra 4 es del 65,52%, la muestra 9 tiene una concentración del 63,84% y la muestra 1 es la que menor concentración de éste ácido graso presenta, 63,39%.

Como se puede observar, existen ligeras diferencias entre las concentraciones de ácidos grasos para las distintas muestras, en función de la presentación y variedad de las mismas. En este caso, es la semilla de lino dorada la que mayor concentración presenta de los ácidos grasos linoleico y oleico.

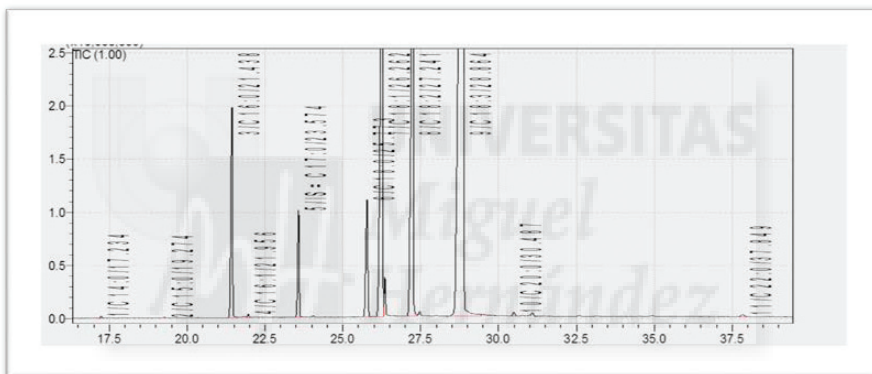


Fig. 38. Perfil cromatográfico

Tabla 38. Perfil de ácidos grasos en semillas de lino

ÁCIDOS GRASOS		
Nombre Común	Nomenclatura	Tiempo de Retención (min)
Mirístico	14:0	17,234
Pentadecílico	15:0	19,274
Palmitoleico	16:1n-7	21,956
Palmítico	16:0	21,438
Heptadecanoico (IS)	17:0	23,574
Linoleico	18:2n-6	27,241
γ -Linolénico	18:3n-6	28,864
Oleico	18:1n-9	26,262
Esteárico	18:0	25,773
Araquídico	20:0	30,487
Behénico	22:0	37,849

IS: patrón interno

Tabla 39. Composición de ácidos grasos de aceite de lino

ÁCIDOS GRASOS	MUESTRAS (%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mirístico	0,070 [±] 0,01	0,076 ^{bc} ±0,04	0,11 ^{ab} ±1,02	0,073 ^{bc} ±0,12	0,073 ^b ±1,09	0,11 ^{ab} ±0,08	0,08 ^{bc} ±1,56	0,13 ^a ±1,00	0,093 ^{bc} ±0,21
Pentadecílico	0,05 [±] 0,06	0,24 [±] 0,01	0,066 [±] 0,86	0,050 ^a ±1,41	0,050 [±] 0,16	0,060 [±] 0,06	0,040 ^a ±0,87	0,083 ^a ±0,47	0,051 [±] 0,07
Palmitoleico	0,160 ^{ab} ±0,26	0,130 ^{cd} ±0,06	0,080 [±] 0,22	0,097 ^{de} ±0,88	0,113 ^{ab} ±1,16	0,187 ^a ±0,44	0,157 ^{ab} ±1,03	0,147 ^{bc} ±0,98	0,086 [±] 0,33
Palmitico	8,04 [±] 0,15	8,43 [±] 0,15	9,86 [±] 0,42	8,31 ^{cd} ±1,11	8,62 ^{cd} ±0,03	9,65 [±] 0,16	8,91 ^c ±1,41	11,25 ^a ±1,19	8,31 ^{cd} ±1,11
Linoleo	9,87b±0,02	15,23 [±] 0,02	7,98 [±] 1,21	8,20 [±] 0,18	10,05 ^b ±0,01	8,80 ^b ±0,41	12,73 ^{ab} ±1,56	11,73 ^{ab} ±0,83	10,41 ^b ±0,02
γ-Linolénico	63,39 [±] 0,02	25,46 [±] 0,04	62,097 [±] 0,99	65,52 [±] 0,97	63,31 [±] 0,41	62,51 [±] 0,76	59,96 ^b ±1,18	63,19 ^{ab} ±1,77	63,84 ^{ab} ±0,46
Oleico	5,813 [±] 0,05	35,873 [±] 0,02	8,143 [±] 1,26	6,053 [±] 1,24	6,70 [±] 2,01	18,26 ^a ±1,21	8,288 ^b ±0,16	5,586 ^c ±1,01	5,876 [±] 1,03
Estearico	7,626 [±] 0,07	9,253 [±] 0,02	7,050 [±] 0,98	6,026 ^d ±0,96	6,343 ^a ±2,14	7,903 ^b ±1,32	5,980 [±] 1,18	5,973 [±] 0,66	6,406 [±] 2,17
Araquídico	0,440 [±] 0,16	0,476 [±] 0,05	0,350 [±] 0,42	0,340 ^d ±0,41	0,286 [±] 1,45	0,446 [±] 0,78	0,283 [±] 1,00	0,826 ^a ±0,73	0,420 [±] 1,05
Docosanoico	0,396 [±] 0,29	0,460 [±] 0,02	0,406 [±] 1,03	0,340 [±] 1,03	0,01 ^b ±0,65	0,286 ^a ±1,32	0,187 [±] 0,88	0,483 ^a ±0,21	0,295 [±] 1,38

Valores seguidos por el mismo superíndice dentro de la misma fila, indica que éstos no fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$), según la prueba de diferencia menos significativa de Tukey. Los valores son promedios de 2 repeticiones ± desviación estándar típica.

4.4.4. RANCIMAT

El método rancimat, incluido en las normas nacionales e internacionales (ISO 6886, AOCS Cd 12b-92), es un método de medición de la estabilidad oxidativa de aceites y grasas en condiciones aceleradas, basado en la inducción de la oxidación de las muestras por exposición a altas temperaturas y caudal de aire. Esto permite estimar el tiempo de inducción o tiempo de estabilidad oxidativa, que es el momento o tiempo transcurrido en el que la muestra ha dejado de ser estable. Es indicativo de la pérdida de calidad y vida útil del aceite.

Las determinaciones se han realizado por duplicado y a los resultados se les ha aplicado un análisis de varianza, para verificar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y condiciones en los diferentes aceites analizados.

En la tabla 40 se muestran los resultados correspondientes a la estabilidad oxidativa de las distintas marcas comerciales analizadas.

Tabla 40. Estabilidad oxidativa de las distintas muestras de semilla de lino

RANCIMAT			
Muestras	Minutos	Réplicas	Minutos
A1	76,2	A1	75,6
A2	30,6	A2	25,8
A3	33	A3	26,4
A4	8,4	A4	8,4
1	65,4	1	59,4
2	118,8	2	119,4
3	139,6	3	140,4
4	41,4	4	42,6
5	61,2	5	74,4
6	10,2	6	28,2
7	10,2	7	22,2
8	89,4	8	94,2
9	7,8	9	10,2

A1: aceite virgen de lino, A2-A3-A4: aceite de semillas de lino en cápsulas

Como se puede observar de los resultados obtenidos, tanto las muestras de semilla de lino como sus réplicas poseen, prácticamente, el mismo tiempo de estabilidad oxidativa, siendo la menor diferencia existente entre ellas de un 0,6% y la máxima de un

79,8%. Concretamente, la muestra 2 presenta un período de inducción oxidativa de 1,98 h.

4.4.5. COLOR

La percepción del color es un factor crítico para la determinación de la calidad en diferentes aceites comestibles. En este estudio, la medición de color se realizó empleando un equipo colorimétrico Kónica Minolta Chroma Meter CR-410 (Serie B8406705/664/1837), Japón (ver Materiales y Métodos).

En la tabla 41 se muestran los valores registrados de L^* , a^* y b^* de la semilla de lino entera. Los resultados se expresan como la media de las cuatro medidas que se realizaron por muestra.

Tabla 41. Determinación de la coordenada de luminosidad (L^*), de la coordenada roja-verde (a^*) y de la coordenada amarillo-azul (b^*) en las distintas muestras de semilla de lino

Código Muestras Semilla de lino	L^*	a^*	b^*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
1	52,75	9,37	34,62	-39,29	+10,08	+13,70	42,82
2	56,48	17,75	26,80	-35,55	+9,62	+15,86	40,11
3	54,35	7,57	24,31	-37,69	+8,29	+13,37	40,84
4	48,22	9,94	21,80	-43,82	+10,66	+10,86	46,39
5	47,39	9,82	20,79	-44,65	+10,53	+9,85	46,93
6	38,36	9,41	9,53	-53,68	+10,13	-1,39	54,65
7	45,42	6,97	14,23	-46,62	+7,69	+3,29	47,36
8	71,13	2,14	25,63	-20,91	+2,86	+14,69	25,71
9	51,04	8,05	23,08	-41	+8,76	+12,14	43,65

4.5. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL UTILIZANDO CÁPSULAS CONTENIENDO ACEITE DE PESCADO RICO EN OMEGA-3

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de tomar complementos alimenticios omega-3 (oxidados vs no oxidados) combinados con una dieta rica en pescado, en los niveles de colesterol, triglicéridos, glucosa y GPT después de 1 mes de intervención. El objetivo secundario fue evaluar el efecto de tomar complementos alimenticios omega-3 (oxidados vs no oxidados) y dieta rica en pescado en el peso (kg), índice de masa corporal (IMC: kg/m^2), relación cintura/cadera, presión sistólica (mmHg) y presión diastólica (mmHg).

En la tabla 42 se observan los resultados correspondientes al riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas, asociadas a la obesidad en el grupo 1 que consumía cápsulas menos oxidadas (C-O) al inicio del estudio (día 1).

Según los resultados obtenidos, se puede observar que, las mujeres intervenidas al inicio del estudio con cápsulas menos oxidadas presentaron un perfil lipídico circulante con un riesgo menor de desarrollar complicaciones metabólicas, siendo para 5 de las participantes intervenidas ligeramente aumentado, alto para 2 de las participantes y muy alto para 3 de las participantes intervenidas.

Tabla 42. Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo

Grupo 1 Categoría	C-O IMC (Kg/m ²)	Día 1 ICC	Riesgo relativo a partir del perímetro de la cintura	
			Mujeres ≤ 88 cm	Mujeres > 88 cm
Normopeso	18,5-24,9	0,81	Ninguno	Ligeramente aumentado
Sobrepeso	25,0-29,9	0,86	Ligeramente aumentado	Aumentado
Obesidad tipo I	30,0-34,9	0,98	Aumentado	Alto
Obesidad tipo II	35,0-39,9	0,93	Alto	Muy alto
Obesidad tipo III (mórbida)	≥40	-	Muy alto	Muy alto

SEEDO, 2007

En la tabla 43 se observan los resultados correspondientes al riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad en el grupo 2, que consumía cápsulas más oxidadas (C+O) al inicio del estudio (día 1).

Según los resultados obtenidos, podemos observar que, las mujeres intervenidas al inicio del estudio con cápsulas más oxidadas presentaron riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas, siendo en este caso ligeramente aumentado para 7 de las participantes, alto para 4 y muy alto para 2 de las participantes intervenidas.

Tabla 43. Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo

Grupo 2 Categoría	C+O IMC (Kg/m ²)	Día 1 ICC	Riesgo relativo a partir del perímetro de la cintura	
			Mujeres ≤ 88 cm	Mujeres > 88 cm
Normopeso	18,5-24,9	0,78	Ninguno	Ligeramente aumentado
Sobrepeso	25,0-29,9	0,87	Ligeramente aumentado	Aumentado
Obesidad tipo I	30,0-34,9	1	Aumentado	Alto
Obesidad tipo II	35,0-39,9	0,99	Alto	Muy alto
Obesidad tipo III (mórbida)	≥40	0,74	Muy alto	Muy alto

SEEDO, 2007

En la tabla 44 se observan los resultados correspondientes al riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad en el grupo 3, que sólo consumía la dieta (D) al inicio del estudio (día 1).

Según los resultados obtenidos, podemos observar que, las mujeres intervenidas al inicio del estudio con dieta presentan riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas, siendo en este caso ligeramente aumentado para 4 de las participantes intervenidas, aumentado para 4 y muy alto para 4 de las participantes intervenidas.

Tabla 44. Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo

Grupo 3 Categoría	D IMC (Kg/m ²)	Día 1 ICC	Riesgo relativo a partir del perímetro de la cintura	
			Mujeres ≤ 88 cm	Mujeres > 88 cm
Normopeso	18,5-24,9	0,88	Ninguno	Ligeramente aumentado
Sobrepeso	25,0-29,9	0,80	Ligeramente aumentado	Aumentado
Obesidad tipo I	30,0-34,9	0,88	Aumentado	Alto
Obesidad tipo II	35,0-39,9	0,92	Alto	Muy alto
Obesidad tipo III (mórbida)	≥40	0,86	Muy alto	Muy alto

SEEDO, 2007

En la tabla 45 se observan los resultados correspondientes al riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad en el grupo 1, que consumía cápsulas menos oxidadas (C-O) al final del estudio (día 30).

Según los resultados obtenidos, podemos observar que, las mujeres intervenidas al final del estudio con cápsulas menos oxidadas presentaron riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas, siendo en este caso ligeramente aumentado para 4 de las participantes y alto para 5 de las participantes intervenidas.

Tabla 45. Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo

Grupo 1 Categoría	C-O IMC (Kg/m ²)	Día 30 ICC	Riesgo relativo a partir del perímetro de la cintura	
			Mujeres ≤ 88 cm	Mujeres > 88 cm
Normopeso	18,5-24,9	0,80	Ninguno	Ligeramente aumentado
Sobrepeso	25,0-29,9	0,88	Ligeramente aumentado	Aumentado
Obesidad tipo I	30,0-34,9	0,92	Aumentado	Alto
Obesidad tipo II	35,0-39,9	0,87	Alto	Muy alto
Obesidad tipo III (mórbida)	≥40	-	Muy alto	Muy alto

SEEDO, 2007

En la tabla 46 se observan los resultados correspondientes al riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad en el grupo 2, que consumía cápsulas más oxidadas (C+O) al final del estudio (día 30).

Según los resultados obtenidos, podemos observar que, las mujeres intervenidas al final del estudio con cápsulas más oxidadas presentaron riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas, siendo en este caso ligeramente aumentado para 5 de las participantes, aumentado para 4 y muy alto para 1 de las participantes intervenidas.

Tabla 46. Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo

Grupo 2 Categoría	C+O IMC (Kg/m ²)	Día 30 ICC	Riesgo relativo a partir del perímetro de la cintura	
			Mujeres ≤ 88 cm	Mujeres > 88 cm
Normopeso	18,5-24,9	0,83	Ninguno	Ligeramente aumentado
Sobrepeso	25,0-29,9	0,84	Ligeramente aumentado	Aumentado
Obesidad tipo I	30,0-34,9	0,85	Aumentado	Alto
Obesidad tipo II	35,0-39,9	0,89	Alto	Muy alto
Obesidad tipo III (mórbida)	≥40	-	Muy alto	Muy alto

SEEDO, 2007

En la tabla 47 se observan los resultados correspondientes al riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad en el grupo 3, que consumía sólo dieta (D) al final del estudio (día 30).

Según los resultados obtenidos, podemos observar que, las mujeres intervenidas al final del estudio con dieta presentan riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas, siendo en este caso ligeramente aumentado para 5 de las participantes intervenidas, alto para 6 y muy alto para 1 de las participantes intervenidas.

Tabla 47. Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo

Grupo 3 Categoría	D IMC (Kg/m ²)	Día 30 ICC	Riesgo relativo a partir del perímetro de la cintura	
			Mujeres ≤ 88 cm	Mujeres > 88 cm
Normopeso	18,5-24,9	0,75	Ninguno	Ligeramente aumentado
Sobrepeso	25,0-29,9	0,81	Ligeramente aumentado	Aumentado
Obesidad tipo I	30,0-34,9	0,92	Aumentado	Alto
Obesidad tipo II	35,0-39,9	0,85	Alto	Muy alto
Obesidad tipo III (mórbida)	≥40	0,83	Muy alto	Muy alto

SEEDO, 2007

La obesidad, y especialmente la visceral, confiere un aumento del riesgo de morbimortalidad, no solamente de origen cardiovascular sino también de otras causas, como es el caso del cáncer o la diabetes y sus complicaciones. La mayoría de estudios epidemiológicos poblacionales observan que, la mortalidad empieza a aumentar cuando el índice de masa corporal supera los 25 kg/m² (Troiano et al., 1996).

Los individuos con un IMC superior o igual a 30 kg/m² presentan un aumento de, aproximadamente, entre el 50 y el 100% tanto de la mortalidad total como de la debida a enfermedades cardiovasculares, respecto a la población con un IMC de 20 a 25 kg/m². El aumento de la mortalidad es modesto cuando el IMC se sitúa entre 25 y 30 kg/m² (Manson et al., 1987).

La evaluación del riesgo de morbimortalidad que comporta el exceso de peso debe realizarse siempre en el contexto global de la historia clínica del paciente. Este cálculo del riesgo condicionará la estrategia antiobesidad que se debe seguir. El riesgo va a depender especialmente del exceso de peso, la distribución de la grasa corporal, la presencia de factores de riesgo cardiovascular y otras comorbilidades (Rubio et al., 2007).

De los resultados obtenidos en las tablas 42-47 se deduce que, la determinación del grado de exceso de peso y la distribución de la grasa en el organismo sirven para evaluar el riesgo relativo de que el paciente presente comorbilidades metabólicas, otras enfermedades asociadas a la obesidad y enfermedades cardiovasculares, especialmente dislipemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, y otras patologías.

Para llevar a cabo el desarrollo de este estudio las cápsulas procedentes de las marcas 4 y 11 se seleccionaron para el consumo, ya que presentaron cantidades muy similares de EPA + DHA (300 mg) (tabla 26), pero distintos grados de oxidación del aceite, siendo la marca 4 la que presentó menor grado de oxidación respecto a la marca 11 (tabla 27). El grupo 1 tomó dos cápsulas por día de la marca 4, el grupo 2 tomó 2 cápsulas por día de la marca 11 y el grupo 3 no tomó cápsulas durante un período de 30 días. Todos los grupos siguieron la misma dieta rica en pescado (tabla 16).

En la tabla 48 se observan las características antropométricas y de presión arterial de las participantes al inicio del estudio, en condiciones basales y transcurrido el mes de intervención, final del estudio, en todos los grupos.

Tabla 48. Características antropométricas y presión arterial de las participantes al inicio (día 1) y al final del estudio (día 30). Los resultados se expresan como media \pm sem

Parámetros	Grupo 1 (consume cápsula menos oxidada + dieta)		Grupo 2 (consume cápsula más oxidada + dieta)		Grupo 3 (consume solo dieta)	
	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
Peso (Kg)	70,17 \pm 3,71	69,38 \pm 3,61	68,77 \pm 3,42	67,78 \pm 3,41	75,15 \pm 3,95	74,29 \pm 3,94
Altura (cm)	1,60 \pm 0,02	---	1,59 \pm 0,01	---	1,61 \pm 0,01	---
IMC (Kg/m²)	27,43 \pm 1,41	27,10 \pm 1,34	28,65 \pm 2,13	26,94 \pm 1,36	29,00 \pm 1,50	28,64 \pm 1,45
ICC	86,5 \pm 2,1	85,0 \pm 0,02	87,2 \pm 3,0	82,0 \pm 0,01	86,0 \pm 2,9	83,0 \pm 0,02
PAS (mmHg)	129,9 \pm 0,50	118,2 \pm 0,42*	123,7 \pm 0,66	120,2 \pm 0,41	118,6 \pm 0,37	119,4 \pm 0,41
PAD (mmHg)	77,2 \pm 0,26	68,9 \pm 0,21*	73,9 \pm 0,34	75,1 \pm 0,29	73,3 \pm 0,34	72,8 \pm 0,20

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 1, $p < 0.05$

En la tabla 49 se observan los cambios en los parámetros circulatorios de las participantes al inicio del estudio, en condiciones basales (día 1) y transcurrido el mes de intervención, final del estudio, (día 30) en todos los grupos.

Tabla 49. Cambios en los parámetros circulatorios de las participantes al inicio (día 1) y al final del estudio (día 30). Los resultados se expresan como media \pm sem

Parámetros	Grupo 1 (C-O)		Grupo 2 (C+O)		Grupo 3 (D)	
	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
Glucosa (mg/dL)	103,35 \pm 3,18	116,24 \pm 4,30*	108,96 \pm 11,11	111,37 \pm 2,46	99,72 \pm 4,53	108,26 \pm 2,55
Colesterol (mg/dL)	246,64 \pm 12,92	217,76 \pm 8,98*	232,94 \pm 12,55	237,52 \pm 7,54	236,78 \pm 4,17	227,22 \pm 6,02
TG (mg/dL)	164,41 \pm 15,43	125,52 \pm 12,34*	160,41 \pm 11,34	116,88 \pm 11,43*	174,83 \pm 19,83	130,04 \pm 10,18*
GPT (U/L)	22,70 \pm 2,71	20,69 \pm 3,34	24,90 \pm 2,96	18,46 \pm 1,62	23,54 \pm 3,92	19,94 \pm 2,19

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 1, $p < 0.05$

Las comparaciones entre grupos, aplicando el ANOVA con un solo factor, determino diferencias no significativas en los niveles de glucosa. El colesterol en el grupo 1 (que consumió cápsulas de aceite menos oxidado) se redujo de forma significativa, mientras que en el grupo 2 (que consumió cápsulas de aceite más oxidado) presentaron los valores más altos (tabla 49). Las comparaciones intragrupo mostraron un aumento significativo en la glucosa circulante sólo para el grupo 1 (que consumió cápsulas de aceite menos oxidado) pero clasificándose en valores normoglucémicos (tabla 49). Los niveles de triglicéridos disminuyeron significativamente en los tres grupos de intervención (tabla 49). No hubo cambios estadísticamente significativos en

los valores de transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) (tabla 49). Finalmente, los niveles de presión sistólica y diastólica disminuyeron en el grupo 1 (que consumió menos aceite oxidado), mientras que no se observaron diferencias significativas en los otros dos grupos (tabla 48).

Al aplicar el modelo de regresión general, el único parámetro que varió entre los grupos fue el colesterol circulante, como se observó en el análisis intragrupo. Por lo tanto, la intervención con cápsulas tuvo más impacto que la intervención sólo con dieta. A continuación, se procedió a realizar un análisis de regresión simple, asignando al aceite menos oxidado (marca 4) un valor de -1, a la dieta un valor de 0 y para el aceite más oxidado (marca 11) un valor de +1. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,41 entre los cambios en el colesterol circulante y el consumo de cápsulas de aceite, indicando que la ingesta de las cápsulas podría explicar en un 16,89% la variación del colesterol en un individuo, siendo esta relación modesta pero estadísticamente significativa ($p = 0,0025$). Además, se dedujo que la intervención a corto plazo con cápsulas y dieta tuvo un efecto causal mejor sobre los niveles de colesterol que sólo la dieta. Esta correlación fue positiva ya que, el consumo de aceite más oxidado aumentó significativamente los niveles de colesterol circulante y el consumo de aceite menos oxidado los redujo, significativamente. Por lo tanto, se concluye que el consumo de cápsulas que contienen aceite oxidado puede tener un efecto opuesto al que proclama el producto, al menos durante el período de 30 días que dura el estudio.

Debe mencionarse que, los niveles de presión arterial recomendados para un control adecuado de la hipertensión son 140-90/90-60 mmHg y las medidas de la presión arterial sistólica oscilaron entre niveles de $118,2 \pm 0,45$ a $129,9 \pm 0,50$ mmHg ($p < 0,05$), mientras que las mediciones de la tensión arterial diastólica oscilaron entre $77,2 \pm 0,26$ y $68,9 \pm 0,21$ mmHg. Por otra parte, la literatura confirma que el aumento de 20 mmHg en la presión arterial sistólica y 10 mmHg en la presión arterial diastólica por encima de los niveles normales para la población, doblan el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular.

Finalmente, no se observó reacción adversa en ninguno de los grupos que consumieron estos nutracéuticos. Sólo algunos participantes ($n=3$) experimentaron un reflujo ácido de pescado, advertencia que fue indicada por parte del investigador a las participantes y una de las participantes ($n=1$) alegó que la ingesta de las mismas le causó un cuadro de alergia, el cual cesó al remitir el consumo de las cápsulas omega-3.

Los resultados de este estudio demuestran que, el estado oxidativo difiere, enormemente, entre los suplementos dietéticos a base de aceite de pescado comercialmente disponibles. De acuerdo con los resultados, los altos niveles de peróxidos detectados en algunos de estos suplementos pueden minimizar la eficiencia o los beneficios atribuidos.

En resumen, este estudio evaluó los efectos del consumo de complementos alimenticios que contenían cantidades de omega-3 (EPA+DHA) sobre la reducción de ciertos marcadores del perfil lipídico circulantes. Aunque el grado de oxidación no pudo determinarse directamente en EPA y DHA, los resultados muestran, claramente, que el estado de oxidación del aceite afecta a los potenciales beneficios que estos ácidos grasos pueden ejercer en el control de los parámetros lipídicos circulantes.

4.6. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLAS DE LINO

El objetivo principal de este estudio fue, evaluar el efecto de consumir durante un mes 15 g/día de semilla de lino mezclada con yogur durante el desayuno y, combinada con una dieta enriquecida con pescado, sobre el colesterol total en sangre y los niveles de triglicéridos. El segundo objetivo consistió, en evaluar el efecto de la dieta suplementada con 15 g de semilla de lino sobre el peso (kg), la presión sistólica (mmHg) y presión diastólica (mmHg) después de 1 mes de intervención. La idea era ver si la semilla de lino podía ser una alternativa hipocolesterolemia a las cápsulas de pescado, para evitar los efectos secundarios (reflujos y alergias) o buscar alternativas más naturales y sostenibles para el consumidor. Se eligió el lino por ser la mejor fuente de omega-3 de origen vegetal, y como se ha visto por los resultados del rancimat, muy resistente a la oxidación.

El número total de mujeres que aceptaron participar en el estudio fueron 64 (ver figura 35, diagrama de flujo en Materiales y Métodos). Se llevó a cabo un estudio aleatorio y a simple ciego para uno de los dos grupos paralelos. Un grupo (n = 32) tomó 15 g de semilla de lino diaria, mezclada en 125 g de yogur desnatado en el contexto de una dieta isocalórica rica en pescado (grupo F de “flaxseed”). El segundo grupo estaba constituido (n = 32) como grupo control de comparación y consumió diariamente 125 g de yogur desnatado en el contexto de la misma dieta (grupo D de “dieta”).

Los grupos F y D presentaron al comienzo del estudio niveles de colesterol total superiores a los límites saludables (>200 mg/dL). En este diseño, el grupo D fue

considerado como el control del grupo F, ya que siguió la misma dieta con la única diferencia que, la semilla de lino se omitió en el yogur desnatado ingerido en el desayuno.

Las condiciones iniciales de ambos grupos no fueron significativamente diferentes, excepto para la glucosa circulante ($p < 0,03$ para las tres pruebas estadísticas). Para las otras variables estudiadas se obtuvieron los siguientes resultados: colesterol ($p > 0,30$, para las tres pruebas estadísticas), triglicéridos ($p > 0,30$ para las tres pruebas estadísticas), peso ($p > 0,10$ para las tres pruebas estadísticas), presión sistólica ($p > 0,80$ para las tres pruebas estadísticas) y diastólica ($p > 0,30$, para las tres pruebas estadísticas), concretamente t-test, W-test y K-S-test, respectivamente. Por lo tanto, se puede considerar que el punto de partida de ambos grupos fue homogéneo.

Los resultados del análisis intragrupal después de un mes de intervención, indicaron que el grupo F presentó diferencias significativas en el colesterol total, con una disminución de aproximadamente 10,7% (tabla 50).

Tabla 50. Cambios en los parámetros circulatorios de las participantes al inicio (día 1) y al final (día 30). Los resultados se expresan como media \pm sem

Parámetros	Grupo F		Grupo D	
	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
Glucosa (mg/dL)	85,8 \pm 3,5	88,9 \pm 2,5	99,7 \pm 4,6	101,3 \pm 3,6
Colesterol				
Total (mg/dL)	241,5 \pm 4,9	215,9 \pm 6,1*	236,8 \pm 4,2	227,2 \pm 6,1
Triglicéridos (mg/dL)	205,7 \pm 12,2	153,6 \pm 11,0*	192,6 \pm 17,1	144,4 \pm 11,1*

* *Diferencias estadísticamente significativa con respecto al día 1, $p < 0,05$*

El grupo D también redujo significativamente su colesterol total, aunque en menor grado (4,2%). En ambos casos, los valores finales permanecieron dentro de rangos no saludables, debido a que ambos grupos presentaron una hipercolesterolemia pronunciada, posiblemente, requiriendo un período de intervención más largo para normalizar sus niveles de colesterol circulante. En cualquier caso, los resultados indicaron que la dieta ejerció un efecto hipocolesterolémico, siendo más eficaz cuando se combinó con semilla de lino. En cuanto a los niveles de triglicéridos circulantes,

éstos presentaron una reducción similar en ambos grupos (25,2% y 25,4% en los grupos F y D, respectivamente). De acuerdo con los resultados anteriores (tabla 50), esta reducción podría ser, principalmente, debido al efecto ejercido sólo por la dieta. Curiosamente, los niveles de triglicéridos alcanzados en ambos grupos, al final del estudio, estaban en el rango saludable o cerca de él. En conjunto, estos resultados sugieren que la ingesta diaria de 15 g de semilla de lino, en el contexto de una dieta enriquecida en pescado, reduce el colesterol total circulante y los niveles de triglicéridos. En el grupo F se observó un aumento significativo en los niveles de glucosa (tabla 50). Esta observación coincidió con un informe anterior que indicaba un aumento de la glucosa en las dietas suplementadas con ácidos grasos omega-3 (García-Hernández, 2013; Karlström, 2011; Stacpoole, 1989).

Los valores obtenidos se analizaron a lo largo del tiempo, comparando entre sí los valores iniciales y finales de los parámetros, utilizando el modelo de regresión general. Como resultado, los únicos parámetros que cambiaron significativamente con el tiempo fueron el colesterol circulante y los triglicéridos, como se observó en el análisis intragrupo. Así, la intervención con semilla de lino (grupo F) tuvo un impacto más significativo que sólo la dieta (grupo D).

Respecto a la presión arterial cabe mencionar que, las tasas recomendadas para un control adecuado de la hipertensión son 140-90 mmHg para la sistólica y 90-60 mmHg para la diastólica. Se detectó una reducción significativa de ambas presiones en el grupo F (tabla 51). No se registraron cambios significativos en el grupo D. En cuanto al peso corporal, sí se observaron cambios significativos en el grupo D.

Tabla 51. Cambios en los pesos y presión arterial de las participantes al inicio (día 1) y al final (día 30). Los resultados se expresan como media ± sem

Parámetros	Grupo F		Grupo D	
	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
Peso (Kg)	77,1±0,7	76,9±0,7	75,3±1,1	74,8±1,2*
PAS (mmHg)	124,6±0,06	119,7±0,5*	124,7±0,9	124,1±0,8
PAD (mmHg)	75,9±0,7	73,6±0,8*	74,7±0,8	74,6±0,2

* *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al día 1, p < 0,05*

Sin embargo, el cambio en el peso fue modesto y podría deberse principalmente al diseño de una dieta isocalórica, ya que el objetivo principal era normalizar los parámetros lipídicos circulantes y corregir los hábitos de una mala alimentación. Curiosamente, varios participantes continuaron el consumo de semilla de lino, junto con una dieta hipocalórica durante 30 días adicionales, resultando en una pérdida adicional de peso de 1-2 kg. Lamentablemente, este período de tiempo no se incluyó en la intervención y por lo tanto, queda fuera del alcance del estudio.

En resumen, este estudio evaluó los efectos del consumo de 15 g de semilla de lino con yogur desnatado durante el desayuno, en el contexto de una dieta enriquecida con pescado. Como resultado, se observaron los efectos beneficiosos con respecto a los parámetros de lípidos circulantes, con una reducción del 10,7% del colesterol total en el grupo F, duplicando eficazmente los resultados observados en el grupo D. Esto sugiere que, la semilla de lino puede potenciar el efecto hipocolesterolémico ejercido por la dieta y ser una alternativa a las cápsulas de pescado.





DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El Comité Español Interdisciplinario de Prevención Cardiovascular (CEIPC) y la Sociedad Española de Cardiología pusieron de manifiesto su posicionamiento en el tratamiento de las dislipemias (Lobos et al., 2015), así como los puntos convergentes y divergentes que se desprenden del análisis de las guías europeas (CPG Committees, 2008-2012) y americanas (Stone et al., 2014) para el tratamiento de la dislipemia.

Del análisis de ambas guías se deducen elementos comunes pero también otros que muestran disparidad. La guía europea define cuatro categorías de riesgo con sus correspondientes objetivos terapéuticos en cada una de ellas, facilitando así la monitorización de la respuesta terapéutica, mientras que, la guía americana describe distintos tipos de pacientes, según su riesgo cardiovascular, y recomienda el empleo de tratamientos hipocolesterolemiantes con diferentes estatinas y dosis, según la potencia farmacológica y el nivel de riesgo calculado (estatinas de alta, moderada o baja intensidad) (Jesús Millán Núñez-Cortés, 2015).

La diferencia sustancial entre ambas guías radica en que, el planteamiento de la guía europea es más fisiopatológico y con una sólida base científica en la teoría lipídica de la aterosclerosis. Por tanto, la guía está focalizada en los factores de riesgo para prevenir la enfermedad. Por su lado, la guía americana utiliza un planteamiento más farmacológico, focalizado en las estatinas, con datos que se recogen de ensayos clínicos aleatorizados, meta-análisis y revisiones sistemáticas (Jesús Millán Núñez-Cortés, 2015).

Uno de los principales debates que presenta la aplicación de una u otra guía es la repercusión económica resultante. Cuando la patología está muy avanzada y el tratamiento indicado deriva hacia una intervención farmacológica, no hay ninguna duda. El dilema se puede plantear en aquellos individuos que buscan la prevención primaria de la enfermedad o tienen un riesgo bajo o, como mucho, moderado. Es para estos casos, donde las guías presentan disparidad entre ellas con claras tendencias económicas hacia un mayor gasto farmacéutico en la americana (Brotons et al., 2014).

Según el Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007, en su 1ª Conferencia de Prevención y Promoción de la Salud en la Práctica Clínica en España, existen varias estrategias y métodos en prevención, según el nivel de actuación en la evolución natural

de las enfermedades cardiovasculares y sus factores determinantes, a partir de los cuales se obtiene la siguiente clasificación:

- **Prevención primordial:** son medidas encaminadas a disminuir la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular. El objetivo de la prevención primordial es evitar la consolidación de hábitos poco saludables de comportamiento de alto riesgo, que se sabe que contribuyen a elevar el riesgo de enfermedad.
- **Prevención primaria:** son medidas encaminadas a controlar los factores de riesgo cardiovascular, una vez ya presentes, para disminuir la incidencia de la enfermedad. Es una estrategia poblacional, pero también individual, fundamentalmente, desde las consultas de atención primaria, siendo éste el ámbito dónde se detectan y se siguen los pacientes con factores de riesgo cardiovascular.
- **Prevención secundaria:** son medidas encaminadas a disminuir la progresión de la enfermedad cardiovascular, incluso desde los estadios iniciales asintomáticos, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los individuos con patología cardiovascular.

Uno de los objetivos clave de esta tesis, ha sido llevar a cabo medidas encaminadas a la detección precoz de colesterol circulante elevado (hipercolesterolemia) y control de hábitos alimentarios desde la Oficina de Farmacia. En otras palabras, se ha llevado a cabo una **prevención primordial** con el objetivo de potenciar los hábitos saludables, una **prevención primaria** con el fin de controlar factores de riesgo cardiovasculares en usuarias habituales de Oficina de Farmacia y, finalmente, se ha realizado una **prevención secundaria** mediante intervención nutricional, incidiendo en el consumo de ácidos grasos omega-3 procedentes de distintas fuentes naturales, durante el período de un mes.

Esta iniciativa permite, además de la labor que desempeña el farmacéutico proporcionando su ayuda y consejo nutricional, agilizar la detección primaria desde la propia Oficina de Farmacia. Dentro de este marco y dependiendo de la patología y el estadio en que se encuentre la usuaria, simplemente, con la aplicación de una dieta rica en pescado y la suplementación a través de fuentes naturales de omega-3 (cápsulas omega-3 y semilla de lino), se ha conseguido disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, así como detectar otras patologías, de las cuales la propia usuaria no tenía conocimiento alguno hasta ese momento.

Atendiendo a estas consideraciones, la presente investigación ha permitido por otro lado, disminuir los costes que declaran las guías europeas y americanas para el tratamiento de las dislipemias mediante el uso de nutracéuticos, también conocidos como complementos alimenticios. Estos productos se encuentran “de moda” en la actualidad y los facultativos de atención primaria y secundaria están empezando a utilizarlos cada día más, gracias a la mayor concienciación que existe desde la comunidad científica, así como la vuelta por parte de la sociedad a demandar productos de origen natural con los cuales paliar sus distintas patologías. Prueba de ello es, cómo las farmacéuticas, cada día, presentan mayor número de referencias en las estanterías de las Oficinas de Farmacia relacionadas con nutracéuticos de origen natural (plantas, probióticos, antioxidantes, ácidos grasos omega-3, entre otros). Por su parte, la utilización de estos productos debe estar sustentada con las mismas sólidas evidencias científicas con las que se sustentan los fármacos de fabricación sintética.

Tal es la situación actual que, al comparar las evidencias científicas se ha demostrado que dichos productos tienen menos problemas de interacción para la salud del consumidor, siendo muy eficaces a la hora de paliar las distintas patologías. Si a ello se une la creciente demanda que el sector de los nutracéuticos ha recibido por parte del consumidor, se puede llegar a entender por qué, en la actualidad, son las multinacionales farmacéuticas las que quieren empezar a hacerse con el monopolio de los mismos. No hay que olvidar que, no hace mucho tiempo, la propia comunidad médica no creía y prohibía la ingesta de este tipo de productos a sus pacientes.

Desde un punto de vista nutricional, los aceites y grasas no sólo son necesarios sino que, ingeridos en su justa medida y dependiendo de su composición, influyen positivamente en la salud y el bienestar. En este sentido, los alimentos con un perfil lipídico mejorado irrumpen con fuerza en el mercado. Este es el caso de los nutracéuticos objeto de estudio en esta tesis, por la tendencia que existe actualmente, de un consumidor que quiere una alimentación óptima, que aporte calidad nutricional y permita, a su vez, contribuir a una mejora en su calidad de vida.

No se puede obviar que el desarrollo, comercialización y promoción de complementos que contienen aceite de pescado son una diana de especial relevancia para las industrias alimentarias, por sus propiedades nutricionales para la mejora de enfermedades.

El pescado es rico en ácidos grasos esenciales poliinsaturados de cadena larga (C20: ácido eicosanoico y C22: ácido docosanoico) que no se pueden sintetizar y que sólo se pueden adquirir a través de la dieta (Bell, 1995). Además, los AGPI están siendo ampliamente utilizados en la industria alimentaria para obtener alimentos fortificados, ya que, sus ácidos grasos pertenecen a la familia de los omega-3, y sus compuestos están en forma de ésteres.

Este hecho demuestra la necesidad de obtener concentrados de fuentes naturales de mayor accesibilidad para el ser humano. Entre otros beneficios, los ácidos grasos omega-3 representan fuentes alternativas para la producción de alimentos funcionales que ayuden a proteger las membranas celulares, promoviendo el mejor funcionamiento del cerebro y la visión (Rubio-Rodríguez et al., 2010). Para los adultos, el DHA está implicado en el mantenimiento de la función normal del cerebro y del sistema nervioso (Kuratko et al., 2013; Domenichiello et al., 2014).

Se han realizado estudios sobre el EPA y el DHA a partir del fraccionamiento del aceite de pescado y alimentos enriquecidos, y su consumo se ha correlacionado con beneficios para la salud, incluyendo efectos protectores cardiovasculares, como antiarrítmicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, antihipertensivos y antihiperlipidémicos (González-Sarrías et al., 2013).

No obstante y atendiendo a estas consideraciones, es precisamente el efecto antihiperlipidémico el motivo de la elección de esta serie de nutraceuticos para llevar a cabo el presente estudio. Concretamente, se ha trabajado con cápsulas de aceite de pescado omega-3 y semilla de lino de origen natural.

Uno de los aspectos a considerar en la calidad de estos nutraceuticos es la susceptibilidad que presentan estos compuestos a la oxidación. Esta alteración, además de producir una pérdida en la configuración de enlaces, repercute en una posible reducción en el efecto saludable que se le atribuye. La oxidación lipídica, llamada autooxidación, genera sustancias polimerizadas, moléculas volátiles de bajo peso molecular y disminuye el valor nutricional de la fracción lipídica, produciendo compuestos nutricionales indeseables. Estos cambios se desarrollan, prominentemente, en aquellos aceites que carecen de compuestos antioxidantes en sus fuentes naturales y tras su extracción se oxidan muy rápidamente si no se toman las medidas oportunas, como la adición de antioxidantes exógenos. Este sería el caso de los aceites de pescado

encapsulados. Alternativas más estables la presentaría la propia semilla de lino, cuyos aceites se estabilizan por la presencia natural de antioxidantes en la propia semilla. Sin embargo, el desafío se presenta a la hora de extraer los aceites, ya que las semillas presentan rendimientos netamente menores que el pescado.

Teniendo en cuenta todas estas premisas, se llevó a cabo el análisis de 16 marcas comerciales diferentes de cápsulas omega-3 procedentes de pescado. El objetivo fue la determinación de la calidad del aceite, midiendo su grado de oxidación en la presentación comercial (cápsulas) al alcance del consumidor. Durante las primeras fases de la oxidación de una grasa, se dan pequeños e imperceptibles cambios en la composición, sabor u olor, mientras que aparece un lento pero gradual aumento en la concentración de peróxidos. Al final, el proceso culmina con la presencia de productos de descomposición (aldehídos) que, además de ser tóxicos, disminuyen la calidad nutricional de estas grasas.

5.1. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN ACEITES DE PESCADO CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

El aceite de pescado contiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 tales como EPA (20:5n-3) y DHA (22:6n-3) (Sargent et al., 1999; National Research Council, 2011) particularmente susceptibles a la oxidación durante el procesamiento y almacenamiento de los mismos, especialmente en ausencia de cantidades adecuadas de antioxidantes (Mourente et al., 2007). Varios estudios han demostrado que el aceite de pescado oxidado per se es dañino (Huang y Huang, 2004; Gao et al., 2014). Sin embargo, la vitamina E es uno de los antioxidantes más utilizados en los alimentos y se ha demostrado que reduce los procesos oxidativos en los alimentos grasos, como los aceites y margarinas (Gao et al., 2014; Chen et al., 2013). Una mayor dosis de vitamina E es necesaria en las dietas de pescado, particularmente en aquellas con altos niveles de AGPI, debido a que la oxidación de lípidos en la dieta puede reducir el contenido de vitamina E (Baker y Davies, 1997; Puangkaew et al., 2004; Lewis-McCrea y Lall, 2007). Por el contrario, altas dosis de vitamina E pueden ejercer efectos prooxidativos en las LDL y lípidos humanos (Bowry y Stocker, 1993; Ito et al., 1999). Por tanto, es importante establecer las dosis más adecuadas en este tipo de dietas.

Muchos estudios previos han complementado dietas que contienen idénticos valores de oxidación lipídica con niveles graduales de vitamina E, para evaluar las

concentraciones óptimas de la misma en condiciones prooxidantes (Huang y Huang, 2004; Gao et al., 2013a, 2014b, Tocher et al., 2002a, 2003b; Chen et al., 2013). Estudios realizados por Wang et al. (2016) han demostrado que la oxidación lipídica aumentó las proporciones de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y disminuyó las proporciones de EPA y DHA en dietas experimentales.

Los índices de peróxidos observados en este estudio fueron similares a varios estudios anteriores sobre la calidad del aceite de pescado, realizados por investigadores como Higdon et al., (2000). Sin embargo, la presencia de los subproductos de oxidación se le atribuye a la calidad de la materia prima de partida, en lugar de a las condiciones de almacenamiento. La adición de antioxidantes, principalmente vitamina E y vitamina A, en el momento de la encapsulación, pueden minimizar la oxidación lipídica durante la etapa de almacenamiento. No obstante, el estado de oxidación inicial puede afectar al sabor del aceite y, posteriormente, a la aceptación por parte del consumidor. Según estudios previos (Huss, 1975), el límite de aceptabilidad organoléptica para el índice de peróxidos de aceite de pescado crudo es de 7-8 mEq/kg de aceite, y los aceites de todas las cápsulas analizadas en este estudio superan, considerablemente, los valores descritos (tabla 27). No obstante, se asemejan a los valores obtenidos en el estudio de Wang et al. (2016) donde los valores de peróxidos del aceite de pescado fresco fueron de 1,72 mEq/kg. El aceite se sometió, posteriormente, a tres grados diferentes de oxidación (bajo, moderado y alto) calentado a 50°C con aireación vigorosa mientras se monitorizaba el índice de peróxidos a intervalos de 4 h. Los valores finales del índice de peróxidos fueron de 28,29 mEq/Kg (grado bajo de oxidación), 62,79 mEq/Kg (grado moderado de oxidación) y 104,21 mEq/kg (grado alto de oxidación).

Ahora bien, la aceptabilidad organoléptica no es una limitación en el momento del consumo, ya que la encapsulación del aceite oculta los sabores indeseables que causarían el rechazo por parte del consumidor. Como mucho, podrían producir un retrogusto por reflujo gástrico en el consumidor. Ello permite que los subproductos de oxidación de los lípidos presentes dentro de la cápsula, tengan libre acceso al intestino y puedan ser fácilmente absorbidos y distribuidos a través del torrente sanguíneo al resto de órganos del cuerpo.

En consecuencia, de los resultados obtenidos en este estudio y evidencias anteriores, se desprende que las industrias de nutracéuticos han realizado esfuerzos para lograr mejorar la tecnología de encapsulación y así, garantizar a sus clientes que sus

aceites mantengan el grado de oxidación óptimo durante todo el período de vida útil de las cápsulas. Para ello se utiliza el nitrógeno líquido, en función del tipo de forma farmacéutica a encapsular. De hecho, sus estudios han garantizado un índice de peróxidos de menos de 5 mEq/Kg una vez fabricada la cápsula y transcurrido el período de vida útil, en el que el índice de peróxidos sigue manteniéndose por debajo de ese valor. En este caso, es necesario destacar que la calidad del producto final que llega al consumidor va a depender de varios factores, desde el origen y procedencia de la materia prima, de la calidad inicial de la misma y por supuesto, de las buenas prácticas de fabricación (BPF) por parte de la empresa que las desarrolla.

Afortunadamente, el auge de los nutracéuticos y la gran aceptación de los mismos por parte del consumidor, ha permitido que haya más empresas en el mercado dedicadas a esta finalidad, existiendo mayor competencia entre ellas. Esta situación contribuye a esmerarse tratando de distinguirse del resto, ofreciendo las máximas garantías en calidad, seguridad y eficacia de sus productos.

La determinación del índice de peróxidos, proporciona información sobre la calidad de los aceites estudiados y su grado de oxidación en las primeras etapas de la fase de enranciamiento oxidativo. A medida que avanza el proceso de oxidación de los lípidos se desarrollan otros productos secundarios, tales como pentanal, malondialdehído (MDA), entre otros, utilizándose técnicas adicionales para su determinación.

5.2. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO EN ACEITE DE PESCADO CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Los estudios de oxidación de los aceites de pescados se completaron con la prueba del TBARs, que es uno de los métodos más utilizados para medir la oxidación de las grasas y aceites. Los hidroperóxidos (ROOH) son los productos de reacción iniciales más importantes que se generan al oxidarse los lípidos. Son compuestos lábiles, altamente inestables, que se transforman y degradan al reaccionar con los radicales libres y su ruptura origina productos secundarios tales como pentanal, hexanal, 4-hidroxinonanal y malondialdehído (MDA).

Es de interés destacar, que las distintas muestras llevan añadidas vitaminas E y A, sin embargo, entre las distintas muestras difieren tanto la presencia de las mismas

como su concentración. De las 16 marcas analizadas, diez llevaban añadida la vitamina E, seis de ellas no especificaban su contenido y el resto oscilaban desde 0,5 mg hasta 19,8 mg por cápsula. Lo mismo ocurre con las concentraciones de vitamina A, diez de las marcas comerciales no indicaban su contenido y sus concentraciones oscilaban de 0,375 mg a 2,5 mg por cápsula.

Las vitaminas liposolubles son un componente de la familia de los nutrientes lipídicos. Por esta razón, en los prospectos de emulsiones lipídicas intravenosas, la adición de vitamina E se indica explícitamente, pero las otras vitaminas liposolubles no se mencionan, probablemente, porque sólo están presentes en trazas. Sin embargo, las emulsiones lipídicas intravenosas son subproductos de los procesos de refinado de aceite vegetal y animal, y es razonable suponer que las vitaminas liposolubles estén presentes de forma natural (Forchielli et al., 2016). En estas emulsiones se encontraron distintas concentraciones de vitaminas A y D. Además, la literatura actual no proporciona datos sobre la cantidad de vitaminas que estas emulsiones deberían tener (Forchielli et al., 2016).

Precisamente, esto es lo mismo que ocurre con las concentraciones de vitaminas A y E en las cápsulas analizadas en este estudio. La presencia de las mismas es actuar como antioxidante con el fin de prolongar la vida útil del producto, pero no están presentes en cantidad suficiente para cubrir las necesidades diarias recomendadas. Además, no existe ninguna referencia de las cantidades que deberían estar presentes, lo que explica la gran variabilidad entre las distintas marcas comerciales.

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son susceptibles de un rápido deterioro oxidativo. Generalmente, la oxidación de estos aceites dependen de su grado de insaturación, representado por su índice de dobles enlaces (Senanayake, 2002), de la posición dentro de la molécula del triacilglicerol y la composición de los ácidos grasos altamente insaturados (Shahidi, 1996; Senanayake, 2002).

Algunos métodos utilizados en aceites vegetales pueden aplicarse a los aceites de pescado encapsulados. Por ejemplo, en éstos se pueden evaluar los cambios en la composición de sus ácidos grasos durante el almacenamiento (Shahidi, 1995). Márquez-Ruiz, et al., (2002) los evaluaron mediante una combinación de adsorción y cromatografía de exclusión por tamaños. El procedimiento utilizado demostró que, los

polímeros proporcionan una mejor imagen del progreso de oxidación en comparación con el índice de polieno y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs).

Cho et al., (2001), también encontraron que, el contenido en tocoferol y la composición lipídica fueron factores importantes que podrían explicar la estabilidad oxidativa, mediante la evaluación por los cambios medidos en los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). La presencia de fosfolípidos en los aceites mejoró su estabilidad y esto se vio influenciado por la composición de los mismos. Mientras tanto, se evaluó la estabilidad oxidativa de aceites marinos en presencia de extractos de té verde. Se encontró que la presencia de clorofila superaba la actividad antioxidante de las catequinas (Wanasundara y Shahidi, 1998). Sin embargo, los mismos extractos mostraron un efecto antioxidante en un sistema de modelos de carne de pescado (He y Shahidi, 1997).

Otros estudios, como los de Hamam (2004a) y Shahidi (2005b), informaron acerca de la incorporación del ácido cáprico en aceites de algas que contienen ácidos grasos altamente insaturados. La incorporación del ácido cáprico en estos aceites, a pesar de disminuir el grado de insaturación en los productos resultantes, comprometió su estabilidad, como lo determinaron los análisis de dienos conjugados y TBARs. Se consideró que la eliminación o alteración de los antioxidantes endógenos, como los tocoferoles, era la explicación subyacente de esta observación (Decker et al., 2005).

Aunque se han desarrollado muchos métodos nuevos *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante, lamentablemente, no se correlacionan con la capacidad de los compuestos para inhibir el deterioro oxidativo de los alimentos. Esto se debe a que, la actividad de los antioxidantes en los sistemas alimentarios depende, no sólo de la reactividad química del antioxidante (por ejemplo, la eliminación de radicales libres y la quelación), sino también de factores como la ubicación física, la interacción con otros componentes de los alimentos y las condiciones ambientales (por ejemplo, el pH).

Uno de los principales factores que afecta a la actividad antioxidante, es su capacidad para la eliminación de radicales libres en los alimentos, conteniendo componentes lipídicos y acuosos al mismo tiempo. Los antioxidantes hidrófilos son, a menudo, menos eficaces en las emulsiones de aceite en agua que los antioxidantes lipofílicos (Porter, 1993; Frankel, 1998).

En resumen, la determinación del nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) proporciona información sobre los productos secundarios que se originan durante la etapa de enranciamiento oxidativo, y cómo la adición de determinados tipos de antioxidantes permite prolongar la vida útil de estos aceites. Sin embargo, existen otras técnicas que completarían la información sobre el estado oxidativo de los aceites y que es necesario aplicar para tener una información más completa.

5.3. DETERMINACIÓN DE LA MEDIDA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN UV (K_{232} , K_{270} y K_{280}) EN ACEITES DE PESCADO CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar información sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos. La espectrofotometría ultravioleta es, por tanto, uno de los medios más seguros para conocer el estado de oxidación y conservación de un aceite. Coeficientes altos de extinción UV están relacionados con la oxidación o con el desdoblamiento de productos formados durante el almacenamiento del aceite, con el refinado o con ambas cosas a la vez. Los valores bajos de absorbancia corresponden a aceites de buena calidad.

Los valores de K_{232} , K_{270} y K_{280} también fueron variados (tabla 27). La mayoría de las marcas presentaron moderados (marcas 1, 8, 9, 11 y 16) o bajos (marcas 3, 6 y 7) niveles de los subproductos de oxidación. Las otras marcas presentaron niveles moderados de hidroperóxidos conjugados y bajos niveles de productos finales (marca 5), o altos niveles de hidroperóxidos conjugados y niveles moderados de oxidación de los productos finales (marca 12). La marca 14 mostró los más altos valores para todos los subproductos de oxidación.

En el caso de los aceites de oliva, los espectros de emisión de fluorescencia contienen información sobre su contenido en polifenoles y tocoferoles (300-390 nm) (Zandomenighi et al., 2005; Giungato et al., 2004). Estos aceites presentan además de los picos a 445 y 475 nm, un pico a 525 nm y otro a 681 nm. Kyriakidis y Skarkalis (2000) sugirieron que los picos a 445 y 475 nm estaban relacionados con los productos de oxidación de ácidos grasos y que el pico a 525 nm provenía de la vitamina E. También mostraron que, la adición de acetato de vitamina E al aceite de oliva virgen

aumentaba la intensidad de fluorescencia, no sólo a 525 nm sino también a 445 y 475 nm. Los autores indicaron además, que esto se debía a la vitamina E oxidada que emite fluorescencia alrededor de esta región. El pico a 681 nm está relacionado con las clorofilas. La muy baja intensidad de los picos a 445 y 475 nm es atribuible al alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados y antioxidantes fenólicos en los aceites de oliva virgen, que proporcionan una mayor protección contra la oxidación.

Los valores K_{232} y K_{270} fueron medidas espectrofotométricas para cuantificar la absorción UV a 232 nm (K_{232}) y 270 nm (K_{270}) respectivamente, de una solución del aceite en ciclohexano. Los valores altos de K_{232} y K_{270} indican la presencia de sistemas conjugados con dienos y trienos (Guzmán et al., 2013). Los aceites de sésamo y de semilla de lino tienen una absorción en la región UV con bandas entre 220 y 320 nm, lo que sugiere la presencia de ácidos grasos insaturados, incluyendo los ácidos oleico y linoleico, los cuales son los principales responsables de la banda de absorción amplia con un máximo de 280 nm (Magalhães et al., 2014).

A la luz de estos estudios y dado que, los fluoróforos en aceites comestibles son compuestos químicos de naturaleza muy diferente, directamente relacionados con los mecanismos de oxidación, la espectroscopia de fluorescencia se considera una técnica adecuada para evaluar el estado oxidativo de los aceites (Guzmán et al., 2013).

En cualquier caso, la determinación del coeficiente de extinción molar K debe ser considerada con precaución, ya que otras sustancias añadidas al suplemento, no necesariamente son subproductos de la oxidación de lípidos y podrían presentar absorción ultravioleta en la misma longitud de onda. La falta de información sobre la composición de los aceites no permitió llegar a una conclusión más específica.

Por tanto, la determinación de la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta proporciona información sobre la calidad de la materia grasa, su estado de oxidación, conservación, así como las posibles modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos. Además, existen otras sustancias que se absorben en la misma longitud de onda del UV sin ser, necesariamente, subproductos de la oxidación.

En base a los resultados de oxidación obtenidos, se decidió valorar otra opción más sostenible como fuente natural de ácidos grasos omega-3.

5.4. EXTRACCIÓN DE ACEITE PROCEDENTE DE SEMILLA DE LINO CON EQUIPO SOXHLET Y ULTRASONIDOS

Llegados a este punto y sobre la base de las ideas anteriormente expuestas, se debe hacer una reflexión atendiendo a las siguientes consideraciones: mientras que el suministro de los mercados de América del Norte y Europa para especies tales como el salmón del atlántico y la lubina europea provienen, principalmente, de acuicultura, el bacalao y los atunes se capturan, principalmente, de las poblaciones silvestres.

Se abordó la cuestión de cuál sería el estado de estas poblaciones silvestres en un futuro a medio plazo, a pesar de los efectos del cambio climático (Quaas et al., 2016).

Worm et al. (2006) predijeron el colapso de las últimas poblaciones de peces silvestres restantes para 2048. Aunque su predicción era pesimista, se basó en la extrapolación de una regresión en series temporales del porcentaje de taxones de peces colapsados (Branch, 2008; Hilborn, 2007).

Si bien es cierto, se ha demostrado que el calentamiento y la acidificación de los océanos afectan al comportamiento de los peces, a su metabolismo, a las tasas de crecimiento y a su supervivencia (Frommel et al., 2012; Baumann et al., 2012). Sin embargo, la tecnología pesquera ha estado progresando, reduciendo continuamente los costos de pesca (Squires y Vestergaard, 2013), mientras que la demanda de pescado y mariscos está aumentando constantemente (FAO, 2014) debido al aumento de los ingresos y al crecimiento de la población mundial. Es probable que, estas tendencias mundiales intensifiquen la presión pesquera sobre las poblaciones silvestres (Quaas et al., 2016).

Dentro de este marco y las conclusiones derivadas del mismo, se hace necesario el aunar esfuerzos y valorar otras opciones más sostenibles que las que el propio mercado ofrece. Vinculada a la búsqueda de una fuente natural de ácidos grasos omega-3, el grupo de trabajo se decantó por las semillas de lino y sus aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados. Además, la literatura científica describe sus conocidas propiedades beneficiosas para el organismo y su uso desde tiempos ancestrales.

En las semillas de lino, a lo largo de este estudio, se han realizado una serie de determinaciones bromatológicas. Concretamente, para la extracción de su aceite, se utilizaron los métodos soxhlet y ultrasonidos.

La extracción sólido-líquido en caliente se utiliza en la obtención de principios activos de los tejidos vegetales. Esta técnica es la que se ha utilizado para la extracción del aceite de la semilla de lino mediante equipo soxhlet y ultrasonidos.

El contenido de aceite en las semillas de lino depende de la variedad, las condiciones climáticas y del lugar donde fueron cultivadas (Gallegos, 2008; InfoAgro, 2014). La dificultad que puede presentarse en la extracción es que, el aceite de lino está fuertemente atrapado en los gránulos intracelulares. Además, las semillas tienen una estructura leñosa. Por esta razón, el material debe ser triturado previamente, para permitir una mayor área de contacto entre el material sólido y el disolvente. Las pequeñas partículas resultantes de la molienda facilitan la extracción por parte del disolvente, al permitir un contacto directo disolvente-aceite (Morris, 2001; Best, 2004; Turatti, 2000). Esto explica por qué la marca 9 dio el mayor rendimiento de extracción, debido a que la molienda permitió tamaños de partícula más pequeños que facilitaron el contacto disolvente-aceite.

Varios estudios han demostrado que, la composición del aceite puede variar dependiendo del método de extracción utilizado (Thongson et al., 2004). Por lo tanto, es importante identificar todos los parámetros que participan durante la extracción. Estos afectarán a las propiedades y composición del aceite, así como a su eficacia nutricional después del consumo. Por esta razón, son factores importantes del rendimiento de la extracción, la presentación inicial del producto, es decir, si se trata de semilla entera, triturada o molida; el tiempo de extracción y la temperatura del proceso. El tiempo establecido es diferente para los métodos soxhlet y ultrasonidos, siendo de 360 y 180 min, respectivamente. En cuanto a la temperatura de extracción, el método soxhlet se realiza a 40°C, mientras que la extracción ultrasónica se realiza generalmente a temperatura ambiente (22-24°C).

El rendimiento medio de aceite obtenido en este estudio utilizando soxhlet (36,9%) puede considerarse como adecuado, pero es ciertamente, mucho menor que el indicado anteriormente por Backer, (1978), que obtuvo resultados entre el 80%, utilizando extracción mecánica, y el 80-90%, utilizando extracción con disolventes a una temperatura de 121°C, muy lejos de las condiciones de temperatura ambiente utilizadas en el presente estudio. Por otra parte, se encontró que el porcentaje de aceite extraído utilizando diferentes disolventes en el presente estudio era más alto que el de otros autores (Ahsan et al., 2015; Mata, 2009).

Por lo tanto, con respecto a la metodología utilizada para la extracción, los resultados de mayor rendimiento se han obtenido con el equipo soxhlet. Esto se debe, en parte, a que el vapor no está directamente en contacto con el disolvente en estado líquido y la cantidad de aceite que se degrada es menor cuando aumenta la temperatura (AOAC, 1998). En este contexto, el considerable rendimiento de aceite obtenido con el equipo soxhlet es el resultado de la transferencia de masa entre muestras y disolventes a alta temperatura debido al aumento de la presión de vapor, lo que disminuye la viscosidad.

Respecto al disolvente utilizado, el éter dietílico obtuvo los mejores resultados en el método de extracción soxhlet, confirmando informes previos que indicaban que este disolvente era más eficiente en la extracción de hidrocarburos acíclicos (Tornabene et al., 1982).

Por otro lado, los mejores resultados para el método de extracción con ultrasonidos, se obtuvieron cuando el éter de petróleo fue el disolvente seleccionado. Estos son resultados positivos porque, los dos disolventes tienen baja toxicidad para los seres humanos y el medio ambiente y son relativamente fáciles de tratar y eliminar (Metherel et al., 2009). En cualquier caso, los solventes utilizados en este estudio son reconocidos como de bajo riesgo para la salud humana (European Medicines Agency, 2009).

En resumen, el contenido de aceite de las semillas de lino depende de varios factores. Por un lado, está la variedad, el lugar donde se cultiva y la climatología, y por otro lado, el método de extracción utilizado. De los métodos escogidos, para la extracción del aceite así como de los disolventes utilizados, se ha conseguido un rendimiento óptimo de aceite que ha permitido determinar su composición en ácidos grasos.

5.5. METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE LA SEMILLA DE LINO

Los ácidos grasos consisten en una cadena hidrocarbonada, generalmente lineal, de longitud variable, con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo y un grupo metilo (-CH₃) en el extremo opuesto. No son lo suficientemente volátiles para examinarlos fácilmente, por cromatografía de gases y por ello, deben ser esterificados. La esterificación les proporciona un grupo metilo que les confiere una menor polaridad y

una mayor volatilidad. Por lo tanto, las muestras deben ser hidrolizadas y transesterificadas previamente, lo que permite obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES).

Se ha observado que, el contenido promedio de aceite de lino crudo obtenido era $32,2 \pm 0,4$ g/100g. El contenido de grasa registrado en el presente estudio es similar a los valores publicados por Khan et al., (2010) que encontraron un porcentaje de aceite de 36,6 g/100g en semilla de lino. En la harina de semilla de lino se han encontrado como ácidos grasos predominantes los ácidos oleico, linoleico y α -linolénico, detectados en el presente estudio en las muestras crudas de semilla de lino: $18,6 \pm 0,3\%$ de oleico, $11,8 \pm 0,4\%$ de linoleico y $50,2 \pm 0,7\%$ de α -linolénico. El patrón de distribución de los ácidos grasos oleico y linoleico fue coincidente con el de otros estudios: 14,8-22% y 16,1-18,2%, respectivamente (El-Beltagi et al., 2007). El principal ácido graso presente en la semilla de lino fue el α -linolénico. El contenido de α -linolénico encontrado en la semilla de lino entera en el presente estudio confirma los resultados de Nykter et al., (2006) que encontraron ácido α -linolénico en el rango de 52,8%-60,4%. El análisis cromatográfico de los aceites de estas semillas permitió identificar en ellos los ácidos grasos como el mirístico (C14:0), pentadecílico (C15:0), palmitoleico (C16:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), γ -linolénico (C18:3), oleico (C18:1), esteárico (C18:0), araquídico (20:0) y behénico (22:0).

Las principales fuentes alimentarias del ácido α -linolénico son los aceites vegetales, principalmente los aceites de canola y de soja. Otras fuentes alimentarias ricas en ácido α -linolénico son: aceite de oliva (1 g/100g), aceite de nuez (14 g/100g), aceite de soja (9 g/100 g) y aceite de canola (13 g/100g) (USDA, 2002).

Aunque una parte del ácido α -linolénico se convierte en ácidos grasos omega-3 de cadena larga en el organismo, el grado de esta conversión es modesto y controvertido. Por ejemplo, Emken et al. (1999) indicaron una conversión del 15%, mientras que Pawlosky et al. (2001) encontraron 0,2%. Ambos informaron que la conversión a DHA fue mucho menor que a EPA.

Recientemente, ha habido un creciente interés en las propiedades probióticas del lino y en sus efectos beneficiosos sobre la enfermedad coronaria, algunos tipos de cáncer, trastornos neurológicos y hormonales (Huang y Ziboh, 2001; Simopoulos, 2002). Los efectos beneficiosos se deben, principalmente, a los lípidos del lino. El

aceite de lino es la fuente vegetal más rica en ácidos grasos poliinsaturados linoleicos (omega-6) y linolénicos (omega-3), que son esenciales para los seres humanos, ya que no pueden ser sintetizados en el organismo y deben ser ingeridos en los alimentos. El aceite de lino supera en contenido de AGPI a aceites tales como el aceite de soja, el aceite de girasol, el aceite de colza o el aceite de oliva, entre otros.

Estudios realizados por Tańska et al. (2016) determinaron que el ácido graso más valioso es el ácido α -linolénico (ALA), ya que se encuentra en pequeñas cantidades en otros aceites vegetales. ALA representó del 36,66% al 53,19% de la cantidad de ácidos grasos. El segundo ácido graso poliinsaturado en los aceites estudiados fue el ácido linolénico, cuya proporción no superó el 18%. En total, la proporción de estos ácidos grasos esenciales ascendió a valores entre 52-71%. Los valores de la proporción de ácidos grasos omega-3/omega-6 calculados para los aceites de lino, se diferenciaron significativamente, de 4,3:1 a 2,3:1.

La proporción de los principales ácidos grasos monoinsaturados, ácido oleico, osciló entre el 17,39% y el 29,66%. A su vez, los ácidos grasos saturados: palmítico, esteárico, araquídico y mirístico presentaron un promedio de 8,01%, 5,54%, 0,51% y 0,22%, respectivamente. La composición de ácidos grasos de los aceites es consistente con los resultados obtenidos por Bhatti (1995), quien dijo que, con el aumento de la cantidad de ALA disminuye la participación del ácido oleico en el aceite de lino.

Los aceites analizados en este trabajo demostraron una mayor variación en el porcentaje de los ácidos mirístico, esteárico y araquídico (coeficiente de variación >20%). A su vez, los coeficientes de variación de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados fueron del 12,5% y 13,9% respectivamente, para el ácido linolénico. La composición de ácidos grasos tan diferentes que presentan los aceites, podría deberse a las diferentes variedades de semillas utilizadas en la producción del aceite o de sus mezclas.

Zang et al. (2011), evaluaron las características de los aceites de la semilla de lino procedentes de dos variedades diferentes, concretamente, *fibre-flax* y *oil-flax* (la planta se cultiva ya sea como un cultivo de fibra o como un cultivo de aceite, con fibra (lino) derivado del tallo de las variedades de tipo de fibra y el aceite de semillas de variedades de tipo de aceite (Jhala y Hall, (2010); Zhang et al., (2011)). Este grupo

declaró que los ácidos grasos obtenidos del aceite de semillas tipo *oil-flax* contenía más ácido linoléico (58,03%) que el aceite obtenido de semillas tipo *fibre-flax* (47,37%).

Recientemente, se ha observado un interés significativo en nuevas variedades de semillas de lino con proporciones alteradas de ácidos grasos. En las variedades tradicionales, el contenido de ALA se encuentra en el intervalo de 34,1-64,6%, mientras que en las modificadas (por mejora genética) el intervalo es de 1,6% a 39,1% (Nykter, 2006). Según las investigaciones de Gambús et al. (2003), la composición de ácidos grasos en aceites de semillas de variedades tradicionales de lino (Oro húngaro y Opal) cultivadas en Polonia fue la siguiente: el ácido palmítico representó el 5,8% y el 9,2%, 2,9% y 5,2% de esteárico, 18,5% y 27,9% de oleico, 12,3% y 16,0% de linoleico, y ALA con 44,6% y 59,7%, respectivamente. Una de las variedades modificadas es una variedad llamada “linola” con un nivel relativamente bajo de ácido linoléico (hasta un 2% del contenido total de ácidos grasos) y un nivel muy elevado de ácido linoleico (hasta un 71% del contenido total de ácidos grasos) (Chen et al., 2015). Esta modificación (variedad linola) contribuyó, significativamente, a mejorar la estabilidad del aceite. Además, el clima en el norte de Europa es muy adecuado para la producción de semillas de linola (Hasiewicz-Derkacz, et al., 2015). La diversidad en la composición de ácidos grasos en los aceites también puede ser causada por condiciones ambientales y de crecimiento (Gunstone, 1996). En la práctica, lo más importante es la atmósfera, cuanto más frío es el clima, mayor es el contenido de ácidos grasos insaturados (Fjallstrom et al., 2002). Esto se corrobora por los resultados obtenidos por Choo et al. (2007), que estudió, entre otros, la composición de ácidos grasos de aceites de lino originarios de Inglaterra, Australia y Nueva Zelanda. Los aceites de Australia y Nueva Zelanda tienen en su composición cantidades inferiores de ALA en comparación con los de Inglaterra. A su vez, Kasote et al. (2013) demostraron que la composición de ácidos grasos también cambia dependiendo del número de prensados. Por ejemplo, el contenido de ALA es el más alto en aceite después de presionar dos veces. Además de los métodos de obtención, un método de limpieza puede ser importante para la composición de ácidos grasos de los aceites de semilla de linola. Prescha et al. (2014) informaron que la proporción de ALA aumentó en aproximadamente un 5% en el aceite refinado al compararlo con el aceite sin refinar prensado en frío. Sin embargo, la proporción de ácidos grasos saturados fue similar en ambos aceites. La composición de

ácidos grasos es el principal factor que determina la susceptibilidad de los aceites a la oxidación.

Por tanto, la identificación de la composición de los distintos ácidos grasos de las semillas de lino se determinó por cromatografía. La diversidad de los mismos se debe a las distintas variedades de semillas utilizadas en la producción del aceite, a las condiciones ambientales, al número de prensados y a la climatología, cuanto más frío mayor contenido de ácidos grasos insaturados.

Una vez analizados los ácidos grasos presentes en las semillas de lino utilizadas en nuestro estudio, se determinó la vida útil de dichos aceites, con la idea de ver si eran tan susceptibles a la oxidación como los aceites de pescado anteriormente mencionados.

5.6. RANCIMAT

La técnica rancimat es un método de medida de estabilidad oxidativa de aceites y grasas en condiciones aceleradas, basado en la inducción de la oxidación de la muestra, por exposición a elevadas temperaturas y flujo de aire. Con este fin, se acelera el proceso de envejecimiento de la muestra exponiéndola a volúmenes incrementados de fuentes de calor y aire. En el presente trabajo de investigación, se evaluó la estabilidad oxidativa de aceites procedentes de distintas variedades de semilla de lino.

El aceite de semilla de lino se ha incorporado en matrices de alimentos tales como, la leche, el yogur, el pan y en cápsulas como suplementos dietéticos (Jhala y Hall, 2010; Choo et al., 2007), entre otros. Sin embargo, el alto grado de insaturación de sus ácidos grasos hace a este aceite altamente susceptible a la oxidación durante el procesado y almacenamiento, debido a varios factores como el calor, la luz y el oxígeno (Choo et al., 2007). Como resultado de la oxidación, los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y vitaminas pierden sus propiedades biológicas y pueden formar productos tóxicos, a veces con carácter carcinógeno (Nykter, 2006).

Los compuestos bioactivos de la semilla de lino (esteroles, tocoferoles, carotenoides, clorofilas, fosfolípidos, etc.), también llamados fracción insaponificable, presentan un contenido que oscila entre 0,39% y 0,78%. Esta fracción juega un importante papel en el retraso del deterioro del aceite (Shim et al., 2015). Estudios previos han demostrado que, las diferencias en el contenido de compuestos bioactivos del aceite de semilla de lino se debe principalmente a la variedad (Zhang et al., 2011;

Hasiewicz-Derkacz et al., 2015; Obranović et al., 2015), el clima (Obranović et al., 2015), la madurez de la semilla (Herchi et al., 2012), al método de extracción (Shim et al., 2015; Kasote et al., 2013), y al tiempo de almacenamiento (Prescha et al., 2014). Todos estos factores afectan a la heterogeneidad de los aceites comerciales disponibles, en términos de composición química y calidad. Estudios realizados por Choo et al. (2007) han demostrado que la composición de los ácidos grasos, clorofila y el contenido en plastocromanol-8 pueden jugar un papel significativo en la calidad del aceite. Es importante que la composición química y la calidad de los aceites se analicen inmediatamente después de la fabricación, para así poder establecer la vida útil del producto. Para aceites prensados en frío, normalmente, su vida útil oscila entre 6 a 12 meses (Choe y Min, 2006), pero para el aceite de semilla de lino es incluso más corta, de 5 semanas a 3 meses si se conservan en el frigorífico (Choo et al., 2007). Además, la literatura muestra que un deterioro significativo puede ocurrir durante el almacenamiento a largo plazo. Chowdhury et al. (2015) han mostrado que, los valores de acidez y peróxidos de los aceites extraídos de semillas de lino, recolectadas en Bangladesh, aumentaron ampliamente sobre los 12 meses de almacenamiento. En la misma línea, Prescha et al., (2014) han demostrado que la calidad del aceite de la semilla de lino disminuyó después de 6 meses de almacenamiento. Además, los cambios fueron mayores en el caso de los aceites de semillas de linola, una variedad con bajo contenido de ácido α -linolénico (ALA). Desafortunadamente, la influencia del envasado y el tiempo de los aceites no se tuvieron en cuenta en la estabilidad de los mismos.

A este respecto, la técnica que permite la determinación de la vida útil de un aceite, es la estabilidad oxidativa, realizada mediante la prueba del rancimat. El tiempo de inducción es el tiempo necesario para alcanzar el punto de ruptura de la curva que representa el aumento de la conductividad en función del tiempo. El punto de ruptura se designa como el punto de intersección de las dos partes rectas extrapoladas de la curva (Laübli y Bruttel, 1986). Investigadores como Figueredo et al. (2016), en sus resultados obtenidos para la estabilidad oxidativa en aceite de semilla de lino y de sésamo, muestran que el aceite de lino era susceptible a la oxidación con un período de inducción de 1,95 h, muy similar al obtenido en nuestro estudio 1,98 h, mientras que el del aceite de sésamo fue de 4,88 h.

La susceptibilidad de un aceite a la oxidación, está intrínsecamente relacionada con el contenido de ácidos grasos insaturados, particularmente ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), donde se observó una mayor estabilidad oxidativa en el aceite de sésamo cuyo contenido de AGPI fue de 45,42%, en comparación con el aceite de lino (63,78%) (Figuereido et al., 2016).

Las pruebas de rancimat realizadas por Tańska et al. (2016), demostraron que el aceite más estable a la oxidación presentó un tiempo de inducción igual a 4,35h, mientras que el aceite que mostró menor estabilidad presentó un tiempo de inducción de 2,00h. La muestra que presentó un tiempo de inducción de 4,35h puede ser por un incremento en el contenido de tocoferoles.

En el estudio de Szterk et al. (2010), el tiempo de inducción para el aceite de lino calentado a una temperatura más baja (100°C) y un flujo de aire lento de 2 veces (10L/h) fue de 5,85 h. En contraste, Bozan y Temelli (2008) obtuvieron un menor tiempo de inducción (1,57 h) usando la temperatura de 110°C. La estabilidad de los aceites de lino prensados en frío en puntos de venta al por menor, se referenció por los estudios de Raczyk et al. (2015). El tiempo de inducción de los aceites que ensayaron osciló en el intervalo comprendido entre 3,47-5,63 h. En lo que respecta al aceite de colza prensado en frío, el aceite de lino es aproximadamente dos veces menos estable, y en comparación con el aceite de colza refinado más comúnmente consumido, es cuatro veces más susceptible a la oxidación (Roszkowska et al., 2015). Todos los aceites ensayados en estado fresco se caracterizaron por presentar una buena calidad, debido a su bajo grado de hidrólisis y oxidación.

Por tanto, la técnica rancimat proporcionó información acerca de la vida útil de los aceites analizados en condiciones aceleradas, mediante la exposición de la muestra a volúmenes de calor y aire. El alto grado de insaturación de sus ácidos grasos hace que el aceite sea susceptible a la oxidación, durante el procesado y almacenamiento.

Asimismo, existen otras herramientas de control de calidad. Ciertas cualidades sensoriales de los alimentos que el consumidor aprecia, considerado como un factor psicológico y un criterio a la hora de elegir el producto. Uno de ellos es el color.

5.7. COLOR

El color es una cualidad organoléptica de los alimentos y se aprecia por medio del sentido físico de la vista. También, suele ser considerado un factor psicológico de apreciación y un criterio para elegir un producto alimenticio (Bello, 2008). Es el color la primera característica sensorial apreciada por el consumidor (Rodríguez et al., 1992). Esta impresión óptica se relaciona, de inmediato, con distintos aspectos valorados para la calidad del producto (Tafoya y García, 1993; Cambero et al., 1998). El color es una característica sensorial que es posible describir con parámetros físicos cuantificables. En la industria alimentaria, la medición instrumental de color sirve como herramienta de control de calidad. En el presente estudio se ha medido el color como criterio de calidad.

Los valores de luminosidad (L^*) diferencian a los colores según si son más claros o más oscuros.

La luminosidad (L^*) toma valores entre 0 y 100, donde 0 representa el color negro y 100 el blanco. La muestra que mayor valor de luminosidad presentó fue la número 8 (71,13), dado que se trataba de una muestra que ya estaba molida, seguida de la muestra número 2 (56,48) y la muestra número 3 (54,35). El resto de muestras presentan valores ligeramente inferiores, excepto las muestras 6 (38,36) y 7 (45,42), la muestra 6 corresponde a semilla de color marrón y la muestra 7 es una mezcla de semilla dorada y marrón, por ello presentaron los menores valores de luminosidad.

Según Hardy y Adda (1990), la coordenada rojo-verde (a^*) mide en una escala que toma valores negativos para el color verde y positivos para el color rojo. La muestra que mayor valor de la coordenada a^* presentó fue la muestra número 1 y la que menor fue la número 8 (muestra triturada). En ningún caso se obtuvieron valores indicativos de una coloración verdosa.

La coordenada amarillo-azul (b^*) mide los colores en una escala que toma valores negativos para el color azul y positivos para el color amarillo. Generalmente, esta escala ha sido asociada a la matriz del alimento (Hardy y Adda, 1990).

La muestra número 2 (15,86) es la que mayor valor de color amarillo presentó, seguida de la muestras número 8 (14,69) y la número 3 (13,37). El resto de muestras presentó valores ligeramente inferiores, excepto la muestra correspondiente a la semilla de lino marrón número 6 (-1,39), donde se detectó la tonalidad azul.

El espectro de absorción del β -caroteno muestra dos picos de absorbancia entre los 400 nm y 500 nm, correspondientes al color azul y verde. Según los resultados de fluorescencia correspondientes a una mapa de contorno en semilla de lino, obtenidos por Figueredo et al. (2016), se destaca la emisión de carotenoides que emiten fluorescencia entre 500 y 650 nm, cuando se excitan entre 300 y 420 nm, y de clorofilas que emiten alrededor de 670 nm. Como se observó en la emisión de aceite de sésamo, en el aceite de semilla de lino podría destacarse la emisión del espectro de clorofila. No obstante, a pesar de las emisiones de estos antioxidantes naturales, el aceite de semilla de lino se caracteriza por tener una estabilidad oxidativa más baja que el aceite de sésamo, debido al mayor contenido de ácidos grasos linolénicos que tiene el primero. Estos ácidos tienen tetraenos conjugados como productos de degradación, con un máximo de fluorescencia alrededor de 420 nm (Magalhães et al., 2014).

Otros estudios de color llevados a cabo en emulsiones de aceite de lino, presentaron valores de luminosidad ($L^*>70$) muy similares a los obtenidos en la muestra 8 del presente estudio (71,13), lo que indica que presentan un aspecto brillante. También presentaron valores positivos para la coordenada a^* (región de color rojo) y para la coordenada b^* (región de color amarillo) (Lee y Choo, 2015).

En base a los resultados y evidencias descritas, en virtud de las distintas determinaciones bromatológicas, se puede admitir que el aceite de pescado, por su alto contenido en ácidos grasos omega-3, EPA y DHA, es susceptible a la oxidación durante el procesamiento y almacenamiento del mismo, sobretodo en ausencia de cantidades adecuadas de antioxidantes y que la adición de antioxidantes naturales, como la vitamina E, contribuye a reducir los procesos oxidativos en la matriz de los alimentos en los que se aplica.

Para poder conocer el grado de oxidación de estos aceites, se ha llevado a cabo la determinación del índice de peróxidos, el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) y la determinación de la medida espectrofotométrica de la absorción en la región UV. Los resultados obtenidos en cada análisis han proporcionado datos referentes a los productos primarios y secundarios que se desarrollan durante la etapa de enranciamiento (oxidación lipídica), así como la calidad y el estado de conservación del aceite.

Llegados a este punto y teniendo en consideración el pescado como recurso limitado, se decidió buscar una fuente que estuviera constituida por esos mismos ácidos grasos y que, a su vez, se tratase de una fuente natural, considerablemente más económica y con efectos saludables similares a los obtenidos por las cápsulas omega-3. Para ello, se optó por trabajar con semilla de lino por la composición de sus ácidos grasos y sus efectos beneficiosos en la salud, además de ser un producto muy económico. Se llevaron a cabo varias determinaciones bromatológicas, como el rendimiento de extracción del aceite por dos métodos diferentes, soxhlet y ultrasonidos, el análisis de la composición de sus ácidos grasos, la vida útil de dichos aceites y la determinación de una de las características sensoriales apreciadas por el consumidor (determinación de color).

El proceso de extracción para la obtención del aceite de pescado encapsulado, difiere de los procesos utilizados para la extracción del aceite de semilla de lino, tanto en la tecnología aplicada como en el tiempo invertido en cada uno de ellos. Los aceites de pescado encapsulados pueden, o no, contener distintas cantidades de vitaminas A y E, que actúan como antioxidantes, prologando la vida útil de los mismos, por el contrario, los aceites procedentes de la semilla de lino debido a su contenido en compuestos bioactivos (esteroles, tocoferoles, carotenoides, clorofilas, fosfolípidos, etc.), juegan un papel importante en el retraso del deterioro del aceite. El contenido de aceite de la semilla de lino, depende de la variedad, las condiciones climáticas y el lugar donde se cultivan y la composición de su aceite puede variar, incluso, dependiendo del método de extracción.

Por otro lado, la determinación de la estabilidad oxidativa, mediante la técnica rancimat, permitió determinar la vida útil del producto, ya que en los aceites prensados en frío su vida útil oscila entre 6 a 12 meses, mientras que en los aceites de semilla de lino la vida útil es más corta, de 5 a 3 meses si se conserva en el frigorífico, aunque puede ocurrir un deterioro significativo durante el almacenamiento a largo plazo.

Partiendo de las afirmaciones obtenidas tras los análisis bromatológicos, se decidió llevar a cabo un estudio de intervención en humanos, con la idea de ver los efectos del consumo de estos aceites sobre la salud.

5.8. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON CÁPSULAS CONTENIENDO ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 PROVENIENTES DE ACEITES DE PESCADO

Los ácidos grasos omega-3 de importancia en la fisiología y la nutrición humana son el α -linolénico (ALA; 18:2, n-3), el ácido linoleico (AL; 18:2, n-6), EPA (20:5, n-3) y DHA (22:6, n-3) (Murray et al., 2012). El ácido α -linolénico y el ácido linoleico son ácidos grasos esenciales para la especie humana, ya que cumplen funciones biológicas importantes. Sin embargo, el organismo no puede sintetizarlos al carecer de enzimas capaces de catalizar la formación de dobles enlaces en las posiciones n-6 o n-3, por tanto, hay que obtenerlos obligatoriamente a través de la dieta. A partir del ácido α -linolénico se obtienen los ácidos eicosapentaenoico (EPA; 20:5, n-3) y DHA (22:6, n-3), principalmente, y a partir del ácido linoleico se obtiene el ácido araquidónico (20:4, n-6) (Plourde y Cunnane, 2007).

Los ácidos grasos poliinsaturados ejercen, asimismo, efectos sobre el metabolismo, en concreto, los ácidos omega-3/omega-6 de cadena larga favorecen la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y en otros tejidos e inhiben la biosíntesis hepática de ácidos grasos, de forma que, con ello, facilitan una disminución de los triacilglicerolos circulantes (Clarke et al., 2002; Sampath y Ntambi, 2005). Existen también evidencias que, la sustitución en la dieta de ácidos grasos saturados por ácido linoleico y derivados puede reducir la colesterolemia total y, en concreto, el colesterol ligado a las lipoproteínas LDL o colesterol “malo” (Mensink y Katan, 1992; Kris-Etherton y Yu, 1997; Hu et al., 2001). Estas evidencias son las que, han llevado a elegir la ingesta de EPA y DHA, a través de cápsulas de aceite de pescado, para llevar a cabo la intervención nutricional en mujeres con hiperlipidemias desde la Oficina de Farmacia, siendo estos ácidos grasos cruciales para revertir esta patología, además de un producto muy económico al alcance del consumidor.

Se han observado efectos beneficiosos en los parámetros circulantes de lípidos (colesterol total y/o triglicéridos) en todos los grupos de intervención. Estos resultados confirman efectos similares observados en un estudio de intervención, al administrar 0,33 g/día de EPA + DHA a pacientes de 45-65 años que presentaban hiperlipemia moderada (Carrero et al., 2004). En conjunto, estas observaciones sugieren que el consumo de nutracéuticos con ácidos grasos omega-3, junto con una dieta equilibrada,

contribuye a la estabilización de un perfil lipídico circulante alterado, incluyendo triglicéridos y colesterol.

En este estudio, se observó una disminución de triglicéridos en los tres grupos de intervención, lo que sugiere que la dieta y, probablemente, los ácidos grasos poliinsaturados presentes en ella, sean factores clave para reducir los triglicéridos circulantes. Varios estudios apoyan esta idea (Nodari et al., 2011). Estos efectos parecen ser ejercidos por la disminución de biosíntesis del HDL (Manerba et al., 2010). Sin embargo, estos efectos pueden revertirse cuando se ingieren aceites ricos en omega-6, lo que indica que, la relación omega-3/omega-6 es fundamental para controlar los lípidos circulantes (Roth y Harris, 2010). Además, otros estudios indican que, a pesar del efecto beneficioso que el aceite de pescado puede tener en la disminución de triglicéridos circulantes, también puede aumentar la fracción altamente oxidable de omega-3 (AGPI), que podría contribuir a una situación de estrés oxidativo en ciertos tipos de células. En este contexto, debe indicarse que no todos los ácidos grasos insaturados son citotóxicos. EPA y DHA, que presentan más dobles enlaces que el ácido araquidónico, son menos citotóxicos que este ácido graso. Esta diferencia parece residir en la forma en que EPA y DHA son metabolizados por diferentes tipos celulares, dando lugar a efectos citoprotectores por el aumento del catabolismo eicosanoide y la disminución de la actividad de la ciclooxigenasa-2 (Di Nuncio et al., 2011).

Hay que tener en cuenta que, además de la naturaleza de los ácidos grasos, las cantidades consumidas son también importantes. La ingesta diaria de 43 g de ácidos grasos omega-3 da como resultado una reducción del 30% en triglicéridos circulantes (Skulas-Ray et al., 2008). Sin embargo, las cantidades mencionadas no pueden alcanzarse consumiendo sólo una dieta equilibrada, haciendo necesario, por lo tanto, la ingesta de nutraceuticos en forma de cápsulas (Kris-Etherton et al., 2002). La suplementación también podría ayudar, no sólo en la reducción de triglicéridos plasmáticos, sino también en la reducción del colesterol, tal y como se observó en este estudio. Además, este efecto en la reducción plasmática del colesterol se invierte cuando los suplementos administrados presentan un alto grado de oxidación (como sucede en este estudio), por lo que no está claro que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de los pescados puedan ejercer por sí solos, este efecto protector, reduciendo los triglicéridos circulantes. En este contexto, no se puede descartar la existencia de efectos sinérgicos con otros componentes de la dieta, incluyendo ácido oleico y antioxidantes

naturales, que también están presentes en la dieta proporcionada en este estudio. Por último, otro factor clave es la forma de cocinar. Así, se ha observado que los efectos cardiosaludables de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ocurren cuando el pescado se consume cocido o al vapor pero no frito (Geleijnse et al., 2010).

Otro hallazgo interesante en este estudio fue la disminución de la presión arterial en el grupo que consumió cápsulas de aceite menos oxidado. Existe evidencia científica que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 pueden estimular la producción endotelial de NO (Harris et al., 2003). Esta molécula provoca la relajación del músculo liso permitiendo la dilatación de los vasos sanguíneos, lo que a su vez reduce la presión arterial y favorece la activación endotelial (Appel et al., 1993; Brown y Hu, 2001).

En este contexto, un meta-análisis de 36 estudios indicó que la ingesta de ácidos grasos omega-3, en forma de cápsulas, se correlacionaba, positivamente, con una reducción de 2,1 mmHg en la presión sistólica y de 1,6 mmHg en la presión diastólica (Geleijnse et al., 2002). Por otra parte, la adherencia a la dieta mediterránea está relacionada con una disminución de la presión arterial diastólica (Reddy y Katan, 2004). Varios estudios encontraron una reducción de 3 y 2 mmHg en las presiones sistólica y diastólica, respectivamente, en 180 individuos que consumieron una dieta mediterránea versus una dieta control después de un seguimiento de dos años (Alonso, 2004; Esposito et al., 2004). El origen de estos efectos parece estar asociado a la ingesta no sólo de pescado, sino también de hortalizas y aceite de oliva (Din et al., 2004; Esposito et al., 2004). Una conclusión similar se ha obtenido de otros estudios de cohortes (Masala et al., 2008). En conjunto parece que, la presencia de pescado en el modelo de dieta mediterránea puede aportar efectos beneficiosos sinérgicos en la función endotelial (Harris et al., 2003), además de los proporcionados por el aceite de oliva, los vegetales e incluso el consumo moderado de vino tinto (Karatzi et al., 2008).

En virtud de los resultados obtenidos en la presente intervención, se han observado que las cápsulas de aceite de pescado omega-3 tienen efectos beneficiosos en los parámetros lipídicos circulantes (colesterol y triglicéridos) en todos los grupos intervenidos. Asimismo, se ha observado una disminución de la presión arterial en el grupo que consumió cápsulas de aceite de pescado menos oxidado. Sin embargo, las cápsulas conteniendo aceites oxidados consiguieron los efectos opuestos, aumentando el colesterol total en los grupos que los consumieron. En este sentido, se hace necesario buscar fuentes alternativas de ácidos grasos polinsaturados, que sean menos susceptibles

a la oxidación y que provengan de fuentes más sostenibles. La semilla de lino es la alternativa propuesta en este documento, pero se hace necesario conocer si ejerce similares efectos hipolipemiantes que el aceite de pescado.

5.9. INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLAS DE LINO

La semilla de lino (*Linum usitatissimum* L.), es una planta herbácea que produce semillas de forma ovalada y aplanada, de 4-6 cm de largo, de color marrón oscuro a pálido y brillante. La producción de lino en el mundo fue de alrededor de 2,6 millones de toneladas durante el período 2012-2013 y representa el 1% del suministro mundial de semillas oleaginosas (Bernacchia et al., 2014).

La mayoría de las actividades biológicas conocidas de la semilla de lino se han asignado a los ácidos grasos omega-3/omega-6 (55-60% del perfil lipídico) presentes en esta semilla (Porter et al., 1995; Muik et al., 2005). De ahí, el creciente interés en el uso de la semilla de lino para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Bloedon et al., 2008), además del bajo coste económico para la adquisición de la misma por parte del consumidor.

En cuanto a los niveles circulantes de triglicéridos, éstos se redujeron significativamente en ambos grupos (alrededor del 25%), posiblemente debido a la dieta rica en pescado en una población experimental similar (García-Hernández et al., 2013). Los niveles de colesterol fueron corroborados por informes anteriores, en los que se observaron disminuciones 6-11% en las participantes normocolesterolémicas (Cunnane, 1993; Clark, 1995), 5-17% en sujetos con hipercolesterolemia, después de consumir semilla de lino durante 4-24 semanas (Jenkins, 1999; Patade et al., 2008). No se han observado efectos en cuanto a los niveles de triglicéridos en ninguno de los estudios comentados.

Aunque los resultados obtenidos en el presente estudio son coincidentes con los datos publicados por otros (Pan, 2009), algunas de las peculiaridades de este estudio deben ser tomadas en cuenta, con el fin de explicar los efectos beneficiosos observados para el consumo de semilla de lino. Éstas incluyen: el momento del día en que se consume la semilla de lino, la forma en que la semilla de lino se presenta en la dieta, la cantidad de semillas de lino consumidas y el tiempo de duración para el consumo de la misma.

En lo que respecta al momento del día elegido para la ingesta, la semilla de lino se consume durante el desayuno, momento del día que sigue a 8 horas de sueño, el período de ayuno más largo del día. Este es el momento en que la absorción de nutrientes debe ser favorecida y, por lo tanto, los efectos beneficiosos de la semilla de lino podrían optimizarse mejor, es decir, reduciendo la cantidad de semilla de lino administrada.

El modo en que se presenta la semilla de lino en la dieta podría ser también un punto decisivo. Desde un punto de vista nutricional, la semilla de lino puede administrarse entera o molida. En cuanto a la administración en forma molida, se podría esperar que, este procedimiento favoreciese la oxidación por exposición al aire de los ácidos grasos poliinsaturados. En este contexto ya se demostró, en el estudio con cápsulas conteniendo aceite de pescado, que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados oxidados no tiene la capacidad de disminuir altos niveles de colesterol total en circulación (García-Hernández et al., 2013). Sin embargo, esto no parece ser el caso de la semilla de lino molida, ya que ésta contiene compuestos antioxidantes que previenen la peroxidación lipídica (Malcolmson, 2000), punto ratificado por las medidas del rancimat. Además, la semilla entera puede ser digerida fácilmente en el intestino humano, por lo que la molienda no sería un proceso tan determinante para la absorción intestinal de los nutrientes del lino (Singh, 2011). Esto explica que en otros estudios, no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas, en los perfiles de lípidos circulantes cuando se administraron 30-40 g de semilla de lino al día, tanto entera como molida (Dodin, 2008; Torkan, 2015).

La dosis diaria administrada es otro aspecto fundamental del presente estudio. Mandasescu et al. (2005) encontraron que dosis de 20 g diarios de semilla de lino molida, durante 60 días, redujeron el colesterol total en un 17% en adultos con hipercolesterolemia. En el presente estudio, se han visto efectos hipocolesterolémicos con dosis más bajas y durante la mitad de tiempo. Parece que estos efectos son evidentes sólo en personas con hiperlipemia, ya que el consumo de semilla de lino (40 g/día) no tuvo ningún efecto sobre el perfil lipídico, después de un período de un año en mujeres sanas (Dodin, 2008).

Otro punto clave en este estudio son los componentes de la semilla de lino, responsables de los efectos sobre los niveles de colesterol. De acuerdo con el meta-análisis de Pan et al. (2009), los lignanos parecen ser los candidatos más probables. Los

autores comentan que, el efecto reductor del colesterol de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la semilla de lino, podría estar enmascarados por el consumo de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) en forma de aceite de oliva, cuyo consumo es muy habitual en la zona mediterránea (presente estudio). Por otra parte, se observó que la semilla de lino, combinada con una dieta equilibrada isocalórica y rica en pescado, fue capaz de reducir los niveles de triglicéridos, punto que no ha sido confirmado en estudios previos. Sin embargo, este efecto podría ser debido a la dieta, ya que los niveles de triglicéridos se redujeron en un rango similar en ambos grupos. En conjunto, estas observaciones sugieren que el consumo de semilla de lino, junto con una dieta rica en pescado, contribuye a la estabilización del perfil lipídico circulante en términos de colesterol total y triglicéridos, en oposición a una dieta habitual desequilibrada, donde sólo se observó la reducción del colesterol (Pan, 2009).

Otro hallazgo interesante en el presente estudio, fue el descenso de la presión arterial sistólica y diastólica en el grupo que tomó semilla de lino. Existe evidencia científica que el omega-3 en la semilla de lino puede estimular la producción endotelial de NO, como ya se ha comentado anteriormente para el estudio con cápsulas de aceite de pescado (Poudyal, 2013). Disminuir la presión arterial es beneficioso ya que, la literatura confirma que, un valor de la presión arterial sistólica de 20 mmHg por encima de los niveles normales duplica el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular. Los cambios en el índice de masa corporal no fueron significativos, como era de esperar de una dieta isocalórica, y confirman los resultados observados en un estudio realizado en México sobre los productos alternativos para la pérdida de peso, donde el consumo de semilla de lino no tuvo ningún efecto (Lira-García, 2008).

En este caso, también se han observado efectos hipocolesterolémicos con dosis de 15 g de semilla de lino entera y un descenso de la presión arterial en el grupo que consumió semilla de lino.

Por último, y referente al tema tratado a lo largo de esta tesis y a la importancia que los ácidos grasos que componen tanto el aceite de pescado como la semilla de lino ejercen sobre la salud humana, existe la necesidad y por ende, un interés comercial en seguir invirtiendo en investigación para la obtención de ácidos grasos EPA y DHA, para su potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica, debido al importante papel que estos ácidos grasos juegan en la prevención de enfermedades humanas.

Este tipo de ácidos grasos podrían utilizarse como subproductos, en relación con el uso del aceite de pescado y semilla de lino, como una alternativa económica y de bajo coste para reducir las hiperlipidemias desde la Oficina de Farmacia, así como reducir los problemas de eliminación y contaminación ambiental (Rai et al., 2013).

En los últimos años y gracias a la concienciación por parte de muchos países, organizaciones benéficas y no gubernamentales, así como algunos movimientos de la sociedad civil, se está realizando un gran esfuerzo con el objetivo de reducir el impacto ambiental de la producción y el consumo de alimentos, fomentando así las dietas sostenibles (FAO, 2015).





CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A tenor de los objetivos de la tesis, los resultados obtenidos y su discusión, ha sido posible llegar a las siguientes conclusiones:

Protocolo de actuación en Oficina de Farmacia:

- La puesta en marcha y ejecución de la prueba piloto del Protocolo de Actuación Farmacéutica, en las dos intervenciones nutricionales llevadas a cabo a lo largo de esta tesis, han permitido detectar precozmente, parámetros circulantes y antropométricos alterados en usuarias habituales de Oficina de Farmacia.
- Esta prueba piloto pionera en España ha brindado además, asesoramiento nutricional, mejorado los hábitos alimentarios, reducido los factores de riesgo asociados a las dislipemias y aumentado la calidad de vida de las usuarias.
- La prueba piloto ha reforzado el papel del profesional farmacéutico, del equipo que le rodea, y de la importancia de la atención personalizada a las usuarias de la Oficina de Farmacia.

Caracterización bromatológica de aceites de diversas fuentes alimentarias, conteniendo ácidos grasos poliinsaturados:

- Existe una gran variabilidad entre los resultados obtenidos de los índices de peróxidos de las diferentes marcas comerciales de aceite de pescado encapsulado analizadas.
- Los índices de peróxidos observados en los aceites de pescado encapsulados no muestran ninguna variación cuando se almacenan adecuadamente (condiciones óptimas de temperatura, humedad, luz y antioxidantes), lo que sugiere que la presencia de los subproductos de oxidación es debida a la calidad de la materia prima de partida.
- La oxidación causa el enranciamiento de los aceites de pescado, pero la aceptabilidad organoléptica, no es una limitación en el momento del consumo, ya que la encapsulación de aceite oculta los sabores indeseables, que causarían el rechazo por parte del consumidor.
- Los mejores rendimientos de extracción de aceite de lino se obtuvieron utilizando el método soxhlet y éter de petróleo como disolvente, en una marca de semilla de lino dorada.

- El método ultrasonidos proporcionó rendimientos más bajos de aceite extraído. Sin embargo, este método tiene varias ventajas, incluyendo el uso de tiempos de extracción más cortos y temperaturas más bajas, minimizando así el riesgo asociado a alteraciones en la muestra.
- En la fracción lipídica de las muestras analizadas de semilla de lino, se identificaron ácidos grasos de todas las familias: saturados, monoinsaturados-cis y poliinsaturados omega-3/omega-6. El ácido linolénico fue el ácido graso más abundante (65,52%), lo que perfila a las semillas de lino como fuentes importantes y más sostenibles para este ácido graso.
- El tiempo de estabilidad a la oxidación forzada (Rancimat) correspondiente a las diferentes muestras comerciales de semillas de lino analizadas en nuestro estudio, fue muy similar.

Caracterización nutricional de aceites de diversas fuentes alimentarias, conteniendo ácidos grasos poliinsaturados:

- El nivel de oxidación de los nutracéuticos, elaborados a partir de aceite de pescado, debe ser considerado como un factor clave que puede afectar al perfil lipídico circulante de los consumidores, produciendo un efecto opuesto al reivindicado por el producto.
- Desde el punto de vista nutricional, y en función de los perfiles lipídicos obtenidos, se puede establecer que, la inclusión de 15 g de semilla de lino en yogur, en el contexto de una dieta hipolipidémica diaria, redujo el colesterol total, los triglicéridos y la presión arterial en mujeres con hiperlipidemia, resultando ser una alternativa más sostenible para suplementar en este tipo de patologías.

CONCLUSIONS

Regarding thesis objectives and the obtained results, the following conclusions are raised up:

Working protocol in a pharmacy establishment:

- The set up and execution of a pilot program based in a Protocol of Pharmaceutical Intervention in the two nutritional studies carried out throughout this thesis have helped to detect early altered circulating and anthropometric parameters in habitual pharmacy female costumers.
- This pilot program is pioneer in Spain and has brought out nutritional assessment, improved food habits, reduced the risk factors associated to dislipemias and has increased the users' life quality.
- This pilot program has reinforced the role of the pharmacist, the associated pharmacy team and the importance of personalized attention to pharmacy female costumers.

Bromatologic characterization of oils obtained from different food sources containing polyunsaturated fatty acids:

- There is a huge variability comparing the results obtained from the peroxide indexes of the different encapsulated fish oil trademarks analyzed in this study.
- The peroxide indexes observed in encapsulated fish oils do not show any variations during storage (provided optimal conditions of temperature, humidity, light and antioxidants), suggesting that oxidation products is due to the quality of the primary source.
- Oxidation of fish oils produces rancid flavours, but the organoleptic acceptance is not a limitation for consumption, because encapsulation hides undesirable flavours which would make the consumer rejection of the product.
- The best flaxseed extraction yields were obtained using the soxhlet method and petrol ether as a solvent, in a golden flaxseed trademark.
- The ultrasound method gave lower yields of extracted oil. However, this method has some advantages, including a shorter amount of extraction time and lower temperatures, minimizing the risk associated to sample alterations.

- All types of fatty acids were identified in the lipid fraction of the flaxseed analyzed samples: saturated, cis-monounsaturated and polyunsaturated omega-3/omega-6. Linolenic acid was the most abundant fatty acid (65.52%), indicating that flaxseed is an important and more sustainable source for this fatty acid.
- The stability time of forced oxidation (Rancimat) corresponding to the different commercial flaxseed samples analyzed in this survey was very similar.

Nutritional characterization from different food sources containing polyunsaturate fatty acids:

- The oxidation level of the different fish oil nutraceutical samples has to be taken into account as a key factor affecting consumer's circulating lipid profile, producing an opposed effect to the one claimed by the product.
- From a nutritional point of view, and according to the lipid profiles obtained, it can be concluded that total cholesterol, triglycerides and blood pressure in hipolipemic women was reduced by including 15 g of flaxseed in a yoghurt in the context of a hipolipemic daily diet, being thereby a more sustainable alternative to give supplements in this type of pathologies.



BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Acuerdo 164/2004, de 23 de diciembre, de la Junta de Castilla y León, por el que se aprueba la Estrategia Regional de Salud Cardiovascular en Castilla y León 2005–2007. B.O.C. y L. N ° 250, Miércoles 29 de diciembre de 2004.

AECOSAN, (2017).

www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/subseccion/encuestas_nutricional.es.24 de abril de 2017.

AESAN, (2010).

www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/complementos_alimenticios.htm.10 de octubre de 2011.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española (2011). Disponible en línea: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/Presentación_ENIDE.pdf

Ahn, Y.G., Shin, J.H., Kim, H.Y., Khim, J., Lee, M.K., Hong, J. (2007). Application of solid phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish, *Anal. Chim. Acta* 603: 67–75.

Ahsan, H., Ahad, A., Siddiqui, W.A. (2015). A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. *J. Chem. Biol.* Jan. 20; 84 (2): 45-59.

Alaswad, K., Pogson, G.W., Harris, W.S. (1999). Effect of phenytoin, niacin, gemfibrozil, and omega-3 fatty acids on high density lipoproteins in patients with hypoalphalipoproteinemia. *Prev. Cardiol.* 2: 141–150.

Albert, C.M., Hennekens, C.H., O'Donnell, C.J. et al. (1998). Fish consumption and the risk of sudden cardiac death. *JAMA.* 279: 23-28.

Albert, B.B., Derraik, G.B., Brennan, C.M., Biggs, J.B., Garg, M.L., Cameron-smith, D., ... Cutfield, W.S. (2015). Supplementation with a blend of krill and salmon oil is associated with increased metabolic risk in overweight men 1, 2. *American Journal of Clinical Nutrition*, (3), 1-9.

Alonso, A., de la Fuente, C., Martín-Arnau, A.M., de Irala, J., Martínez, J.A., Martínez González, M.A. (2004). Fruit and vegetable consumption is inversely

associated with blood pressure in a Mediterranean population with a high vegetable-fat intake: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Study. *Br. J. Nutr.* 92: 311–319.

Anand, R.G., Alkadri, M., Lavie, C.J., Milani, R.V. (2008). The role of fish oil in arrhythmia prevention. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* 28(2): 92–98.

Anzaldúa-Morales, A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza.

AOAC, (1998). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC.

Appel, L.J., Miller 3rd, E.R., Seidler, A.J., Whelton, P.K. (1993). Does supplementation of diet with “fish oil” reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch. Intern. Med.* 153: 1429–1438.

Backer, K.W. (1978). Solvent extraction of soybeans. *Journal American Oil Chemistry Society*; 55: 754-761.

Backgrounder for the 2004 FDA/EPA Consumer Advisory: What you need to know about mercury in fish and shellfish. U.S. Food and Drug Administration. Available at: <http://fda.gov/oc/opacom/hottopics/mercury/backgrounder.html>. Accessed November 5, 2007.

Baker, R.T. & Davies, M.S.J. (1997). Modulation of tissue α -tocopherol in African catfish, *Clarias gariepinus*, fed oxidized oils, and the compensatory effect of supplemental dietary vitamin E. *Aquacult. Nutr.* 3, 91–97.

Banegas, J.R., Villar, F., Pérez, C., et al. (1993). Estudio epidemiológico de los factores de riesgo cardiovascular en la población española de 35 a 64 años. *Rev. San. Hig. Pub.* 67: 419–45.

Bang, H.O., Dyerberg, J., & Nielsen, A.B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic Westcoast Eskimos. *Lancet (London, England)*, 1 (7710), 1143-5.

Baumann, H., Talmage, S.C., Gobler, C.J. (2012). Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nature Climate Change*, 2, 38–41.

- Bazan, N.G. (2007).** Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 10: 136-141.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., MacDonald, F.M. & Sargent, J.R. (1995).** Effects of dietary borage oil (enriched in γ -linolenic acid, 18:3(n-6)) or marine fish oil (enriched in eicosapentaenoic acid, 20:5 (n-3)) on growth, mortalities, liver histopathology and lipid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*), *Fish Physiology and Biochemistry*, 14 (5), pp. 373-383.
- Bello, J. (2008).** *Ciencia Bromatológica; Principios Generales de Los Alimentos*, Ediciones Díaz de Santos, S.A., Madrid.
- Berglund, D. (2002).** Flax: New uses and demands. In “Trends in New Crops and New Uses” (J. Janick and A. Whipkey, eds.), pp. 258–360. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Bernacchia, R., Preti, R., Vinci, G. (2014).** Chemical composition and health benefits of flaxseed. *Austin J. Nutri. Food Sci.* 2: 1045.
- Best, D. (2004).** Low-Carb revolution fuels innovation with flaxseed. *Functional ingredient*. <http://www.functionalingredientsmag.com>, 28 de agosto de 2009.
- Bhatty, R.S. (1995).** Nutrient composition of whole flaxseed and flaxseed meal. In: Cunnane SC. *Flaxseed in Human Nutrition*, AOCS Press, Champaign, USA, pp. 22-42.
- Bloedon, L.T., Balikai, S., Chittams, J., Cunnane, S.C., Berlin, J.A., Rader, D.J., Szapary, P.O. (2008).** Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. *J. Am. Coll. Nutr.* 27 (1): 65–74.
- Bowry, V.W. & Stocker, R. (1993).** Tocopherol-mediated peroxidation-the prooxidant effect of vitamin E on the radical initiated oxidation of human low-density-lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 6029–6044.
- Bozan, B., Temelli, F. (2008).** Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresour. Technol.* 99, 6354-6359.
- Branch, T.A. (2008).** Not all fisheries will be collapsed in 2048. *Marine Policy*, 32, 38–39.

- Brotons, C., Calvo-Bonacho, E., Moral, I., García-Margallo, M.T., Cortés-Arcas, M.V., Puig, M., et al. (2014).** Impact of the new American and British guidelines on the management and treatment of dyslipidemia in a Spanish working population. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl Ed)*. 67: 906-11.
- Brown, A.A., Hu, F.B. (2001).** Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 673–686.
- Burdge, G.C. & Calder, P.C. (2005).** Conversion of α -linoleic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45: 581-597.
- Burr, G., & Burr, M. (1929).** A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry*, 82 (8), 345-367.
- Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holliday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C. & Deadman, N.M. (1989).** Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*, 2 (8666): 757-761.
- Calder, P.C. & Yaqoob, P. (2009).** Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*, May-Jun: 35 (3): 266-72.
- Camero, M.I., Fernández, L., García, M.L., García de Fernando, G., de la Hoz, L. y Selgas, M.D. (1998).** Tecnología de los alimentos. Vol. II. Alimentos de origen animal. Ed. Síntesis, S.A. Madrid.
- Carrero, J.J., Baro, L., Fonolla, J., González-Santiago, M., Martínez-Férez, A., Castillo, R., Jiménez, J., et al. (2004).** Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia. *Nutrition* 20: 521–527.
- Carter, J. (1993).** Potential of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. *Cer. Foods World* 38, 753–759.
- Chemat, F., Grondin, I., Costes, P., Moutoussamy, L., Shum, A., Sing, A.S.C., Smadja, J. (2004).** High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil, *Ultrason. Sonochem.* 11: 281–285.

- Chen, Y., Zhou, X.R., Zhang, Z.J., Dribnenki, P., Singh, S., Green, A. (2015).** Development of high oleic oil crop platform in flax through RNAi-mediated multiple FAD2 gene silencing. *Plant Cell Rep.* 34, 643-653.
- Chen, Y.J., Liu, Y.J., Tian, L.X., et al. (2013).** Effect of dietary vitamin E and selenium supplementation on growth, body composition, and antioxidant defense mechanism in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoide*) fed oxidized fish oil. *Fish. Physiol. Biochem.* 39, 593–604.
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M. et al. (1992).** Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal Food Composition and Analysis*, v.5, p.185-197.
- Cho, S.Y., Joo, D.S., Choi, H.G., Nara, E., Miyashita, K. (2001).** Oxidative stability of lipids from squid tissue. *Fish. Sci.* 67, 738-743.
- Choe, E., Min, D.B. (2006).** Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 5, 169-186.
- Choo, W.S., Birch, J., Dufour, J.P. (2007).** Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. Food Compos. Anal.* 20, 202-211.
- Choo, W.S., Birch, J., Dufour, J.P. Physicochemical. (2007).** Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. Food Compos. Anal.* 20, 202-211.
- Chowdhury, K., Monira, O., Sharmin, A.L., Rezaul, K. (2015).** Evaluation on edible oil quality parameters as well as nutritional value of flaxseed (linseed) oil in Bangladesh. *J. Chem. Bio. Phy. Sci.* 5, 401-412.
- Christensen, A., Ostman, C., Westerholm, R. (2005).** Ultrasound-assisted extraction and on-line LC-GC-MS for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urban dust and diesel particulate matter, *Anal. Bioanal. Chem.* 381: 1206–1216.
- Clark, W.F., Parbtani, A., Huff, M.W., Spanner, E., de Salis, H., Chin-Yee, I., Philbrick, D.J., Holub, B.J. (1995).** Flaxseed: a potential treatment for lupus nephritis. *Kidney Intl.*, 1995, 48, 475–480.

Clarke, S.D., Gasperikova, D., Nelson, C., Lapillonne, A., Heird, W.C. (2002). Fatty acid regulation of gene expression: a genomic explanation for the benefits of the Mediterranean diet. *Ann. N.Y. Acad. Sci*; 967: 283-298.

Cobos-Carbó, A. y Augustovski, F. (2011). Declaración CONSORT 2010: actualización de la lista de comprobación para informar ensayos clínicos aleatorizados de grupos paralelos. *Med. Clin. (Barc.)*; 137 (5): 213-215.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. (2014). Declaración de Córdoba, 23 de octubre de 2014. Disponible en: <http://www.portalfarma.com/jornadas-congresos/XIX-Congreso-Nacional-Farmacaceutico/Documents/XIX-CNF-Declaracion-de-Cordoba.pdf>

Corey, E.J., Shih, C. & Cashman, J.K. (1983). Docosaheptaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 3581-3584.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrason. Sonochem.* 15: 898–902.

Culp, B.R., Titus, B.G. & Lands, W.E.M. (1979). Inhibition of prostaglandin synthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostagl. Leukot. Med.*, 3: 269-278.

Cunnane, S.C., Hamadeh, M.J., Liede, A.C., Thompson, L.U., Wolever, T.M., & Jenkins, D.J. (1995). Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 62-68.

Cunnane, S.C., Ganguli, S., Menard, C., Liede, A.C., Hamadeh, M.J., Chen, Z.Y., Wolever, T.M., Jenkins, D.J. (1993). High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br. J. Nutr.*, 69, 443–453.

Dalmau, J., Pena-Quintana, L., Morais, A., Martínez, V., Varea, V., Martínez, M. J., & Soler, B. (2015). Análisis cuantitativo de la ingesta de nutrientes en niños menores de 3 años. Estudio ALSALMA. *Anales de Pediatría*, 82 (4), 255-266.

Dangour, A. D., & Uauy, R. (2008). n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for optimal function during brain development and ageing. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 17 Suppl. 1, 185-188.

Decker, E.A., Warner, K., Richards, M.P., and Shahidi, F. (2005). Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4303-4310.

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, (2008). Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos (59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre). Punto 32.

Decreto 212/1998, de 8 de octubre, por el que se aprueba el II Plan de Salud de la Comunidad de Castilla y León. B.O.C. y L. N° 197, 14 de octubre de 1998.

DeFelice, S.L. (1995). The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology* 6: 59-61.

DeLany, J.P., Windhauser, M.M., Champagne, C.M. & Bray, G.A. (2000). Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72: 905-911.

Deplet, F. (1988). Aditivos y mejoradores de las propiedades sensoriales. Papel de los aditivos en el mantenimiento y la mejora de las propiedades organolépticas de los alimentos. En: *Aditivos y auxiliares de fabricación en las Industrias Agroalimentarias*. Ed: Multon, J.L. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.

Di Nuncio, M., Valli, V., Bordoni, A. (2011). Pro-and anti-oxidant effects of polyunsaturated fatty acid supplementation in HepG2 cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 85: 121–127.

Din, J.N., Newby, D.E., Flapan, A.D. (2004). Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ* 328: 30–35.

Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de junio de 2002, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios.

Dodin, B., Cunnane, B.C., Mâsse, B., Lemay, A., Jacques, H., Asselin, G., Tremblay-Mercier, J., Marc, I., Lamarche, B., Légaré, F., Forest, J.C. (2008). Flaxseed on cardiovascular disease markers in healthy menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, 24, 23-30.

Dodin, S., Lemay, A., Jacques, H., Legare, F., Forest, J.C., Masse, B. (2005). The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, double-blind, wheat germ placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (3): 1390–1397.

Domenichiello, A.F., Chen, C.T., Trepanier, M.O., Stavro, P.M., Bazinet, R.P. (2014). Whole body synthesis rates of DHA from α -linolenic acid are greater than brain DHA accretion and uptake rates in adult rats. *J. Lipid. Res. Jan.*; 55 (1): 62-74.

Dyerberg, J., Bang, H.O., & Hjorne, N. (1975). Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *The American journal of clinical nutrition*, 28 (9), 958-66.

EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *Efsa Journal*, 8 (3), 1461.

EFSA, (2017). www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-supplements

El-Beltagi, H.S., Salama, Z.A., El-Hariri, D.M. (2007). Evaluation of fatty acids profile and the content of some secondary metabolites in seeds of different flax cultivars (*Linum usitatissimum* L.). *Gen. Appl. Plant Physiology*. 33: 187–202.

Emken, E.A., Adlof, R.O., Gulley, R.M. (1994). Dietary linolenic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim. Biophys. Acta.* 1213: 277-288.

Eriksdotter, M., Vedin, I., Falahati, F., Freund-Levi, Y., Hjorth, E., Faxen-Irving, G., ... Palmblad, J. (2015). Plasma Fatty Acid Profiles in Relation to Cognition and Gender in Alzheimer's Disease Patients During Oral Omega-3 Fatty Acid Supplementation: The OmegAD Study. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 48 (3), 805-12.

Escribano Hernández, A., Vega Alonso, A.T., Lozano Alonso, J.E., Álamo Sanz, R., Castrodeza Sanz, J.J., Lleras Muñoz, S. (2010). Estudio del Riesgo de Enfermedad Cardiovascular en Castilla y León. *Gac. Sanit.* Jul.-Aug.; 24 (4): 282-7.

Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., et al. (2004). Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 292: 1440–1446.

Estrategia en cardiopatía isquémica del Sistema Nacional de Salud. (2006). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.

Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M.I., Corella, D., Aros, F., ... Martínez-González, M.A. (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England journal of medicine*, 368 (14), 1279-90.

European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, Reiner, Z., Catapano, A.L., de Backer, G., Graham, I., Taskinen, M.R., Wiklund, O., et al., ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias (2011): The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur. Heart. J.* 32: 1769-818.

European Medicines Agency (2009). Science Medicine Health ICH Topic Q3C (R4) Impurities: Guideline for residual solvents.

FAO, & FINUT. (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: Consulta de expertos. Report 91.

FAO, & WHO. (2008). Interim Summary of Conclusions and Dietary Recommendations on Total Fat & Fatty Acids. Recuperado a partir de http://www.who.int/nutrition/topics/FFA_summary_rec_conclusion.pdf

FAO, (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO, (2015). <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/overview/fao-and-post-2015/sustainable-agriculture/es/>. 17 de enero de 2017.

Federación Farmacéutica Internacional (FIP), (2000). Declaración de principios de buenas prácticas de educación farmacéutica. Disponible en: https://www.fip.org/www/uploads/database_file.php?id=191&table_id=

FEN, & FINUT. (2015). La leche como vehículo de salud para la población. Granada, España.

Figuereido, P.S., Candido, C.J., Jaques, J.A., Nunes, Â.A., Caires, A.R., Michels, F.S., Almeida, J.A., Filiú, W.F., Hiane, P.A., Nascimento, V.A., Franco, O.L., Guimarães, R.C. (2016). Oxidative stability of sesame and flaxseed oils and their effects on morphometric and biochemical parameters in an animal model. *J. Sci. Food Agric. Dec.* 18. [Epub ahead of print].

Fjallstrom, P., Andersson, B., Nilsson, C., Andersson, K. (2002). Drying of linseed oil paints: a laboratory study of aldehyde emissions. *Ind. Corps. Prod.*, 16, 173-184.

Flores, M., Grimm, C.C., Toldrá, F., & Spanier, A.M. (1997). Correlation of sensory and volatile compounds of Spanish “Serrano” dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2178–2186.

Foran, J.A., Hites, R.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Mathews-Amos, A., Schwager, S.J. (2004). A survey of metals in tissues of farmed Atlantic and wild Pacific salmon. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2108–2110.

Foran, S.E., Flood, J.G., Lewandrowski, K.B. (2003). Measurement of mercury levels in concentrated over-the-counter fish oil preparations: is fish oil healthier than fish? *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127: 1603–1605.

Forchielli, M.A., Conti, M., Patrono, D., Mancini, R., Pession, A., Puggioli, C., Bersani, G. (2017). Potential intake of vitamins “A” and “D” through branded intravenous lipid emulsions: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Clin. Nutr. Apr.*; 36 (2): 530-536.

Frankel, E.N. (1998). *Lipid Oxidation*; Oily Press: Dundee, Scotland, pp. 129-160.

Frommel, A.Y., Maneja, R., Lowe, D. et al. (2012). Severe tissue damage in Atlantic cod larvae under increasing ocean acidification. *Nature Climate Change*, 2, 42–46.

Gallegos, W. (2008). Manual de Parámetros Técnicos para el cultivo del lino (*Linum Usitatissimum*), Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), Ecuador.

Gambús, H., Borowiec, F., Zając, T. (2003). Chemical composition of linseed with different colour of bran layer. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 12/53, 67-70.

Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., et al. (2013). Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth, fatty acid composition, and lipid peroxidation of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, fed with dietary oxidized fish oil. *J. World Aquacult. Soc.* 44, 536–546.

Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., et al. (2014). Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. *Aquaculture* 422–423, 84–90.

García Gabarra, A., & Dalmau Serra, J. (2016). Ácido docosahexaenoico. ¿Un ácido graso omega-3 esencial? *ACTA pediátrica*, 74(3-4), 101-106. Gil, Á. (2013). Estructura, funciones y metabolismo de los AGPI. En Á. Gil (Ed.), *Libro Blanco de los Omega-3* (2da ed., pp. 33-55). Ed. Médica Panamericana.

García-Hernández, V.M, Gallar, M., Sánchez-Soriano, J., Micol, V., Roche E., and García-García. (2013). Effect of omega-3 dietary supplements with different oxidation levels in the lipidic profile of women: a randomized controlled trial. *Int. J. Food. Sci. Nutr. Dec.*; 64 (8): 993-1000.

Geleijnse, J.M., de Goede, J., Brouwer, I.A. (2010). Alpha-linolenic acid: is it essential to cardiovascular health? *Curr. Atheroscler. Rep.* 12: 359–367.

Geleijnse, J.M., Giltay, E.J., Grobbee, D.E., Donders, A.R., Kok, F.J. (2002). Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J. Hypertens.* 20: 1493–1499.

- Gester, H. (1998).** Can adults adequately convert α -linolenic acid to eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid? *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 68: 159-173.
- Gil, A. (2016).** Libro Blanco de los Omega-3 (2da ed., pp. 33-55). Ed. Médica Panamericana.
- Giungato, P., Aveni, M., Rana, R., & Notarnicola, L. (2004).** Modifications induced by extra virgin olive oil frying processes. *Ind. Aliment.* 43, 369–375.
- González-Sarrías, A., Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. (2013).** Nutraceuticals for older people: facts, fictions and gaps in knowledge. *Maturitas.* Aug.; 75 (4): 313-34.
- Grundey, S.M., Pasternak, R., Greenland, P., et al. (1999).** Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation.* 100: 1281–92.
- Grundey, S.M. (1999).** Primary prevention of coronary heart disease. Integrating risk assessment with intervention. *Circulation.* 100: 988–98.
- Guidelines Committe, (2003).** European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J. Hypertens.* 21: 1011-1053.
- Gunstone, F. (1996).** Fatty acid and Lipid Chemistry. Blackie Academic and Professional, London.
- Guzmán, E., Baeten, V., Fernández Pierna, J.A., García-Mesa, J.A. (2015).** Evaluation of the overall quality of olive using fluoresce spectroscopy. *Food Chemistry* 173. 927-934.
- Hamam, F., Shahidi, F. (2004).** Synthesis of structured lipids via acidolysis of docosahexaenoic acid single cell oil (DHASCO) with capric acid. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2900-2906.

Hamam, F., Shahidi, F. (2005). Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *Food Chem.* 91, 583- 591.

Hardy, J., Adda, J. (1990). Las características organolépticas del queso. En: *El queso*. Ed: Eck, André. Ed. Omega. Barcelona.

Harris, W.S. (1996). n-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids* 31: 243–252.

Harris, W.S., Pottala, J.V., Sands, S., Jones, P.G. (2007). Comparison of the effects of fish and fish oil capsules on the n-3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 86: 1621–1625.

Hasiewicz-Derkacz, K., Kulma, A., Czuj, T., Prescha, A., Żuk, M., Grajzer, M., Łukaszewicz, M., Szopa, J. (2015). Natural phenolics greatly increase flax (*Linum usitatissimum*) oil stability. *BMC Biotech.* 15, 1-14.

He, Y., Shahidi, F. (1997). Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4262-4266.

Helbaek, H. (1969). Plant collecting, dry-farming and irrigation agriculture in prehistoric Deh Luran. In “Prehistory and Human Ecology of the Deh Lurah Plain, *Memoirs of the Museum of Anthropology*” (F. Hole, K.V. Flannery, and J.F. Neely, eds), pp. 386–426. University of Michigan, Ann Arbor, MI.

Hemwimol, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrason. Sonochem.* 13: 543–548.

Hepler, C.D, Strand, L.M. (1990). Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am. J. Hosp. Pharm.*; 47: 533–43.

Herchi, W., Bouali, I., Bahashwan, S., Rochu, S., Boukhchina, S., Kallel, H., Pepe, C. (2012). Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. *Plant. Physiol. Biochem.* 54, 1-5.

Higdon, J.V., Lin, J., Du, S.H., Morrow, J.D., Ammes, B.N., Wander, R.C. (2000). Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentanoic acid

and docosahexanoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F(2)- isoprostanes. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 714–722.

Hilborn, R. (2007). Reinterpreting the state of fisheries and their management. *Ecosystems*, 10, 1362–1369.

Hillman, G. (1975). The plant remains from Tell Abu Hureyra: A preliminary report. *Proc. Prehist. Soc.* 41, 70–73.

Hooper, L., Thompson, R.L., Harrison, R.A., Summerbell, C.D., Moore, H., Worthington, H.V., ... Ebrahim, S.B.J. (2004). Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), CD003177.

Hopf, M. (1983). Jericho plant remains. In “Excavations at Jericho” (K.M. Kenyon and T.A. Holland, eds.), Vol. 5, pp. 576–621. British School of Archaeology in Jerusalem, London.

Hu, F.B., Manson, J.E., Willet, W.C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J. Am. Coll. Nutr.*; 20: 5-19.

Huang, C.H. & Huang, S.L. (2004). Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture* 237, 381–389.

Huang, S., Ziboh, A. (2001). Gamma-linolenic acid: Recent advances in biotechnology and clinical applications. Champaign, IL, AOCS Press.

Huss, H.H. (1975). Principal changes during storage wet fish FAO/DANIDA training course on quality aspects in the handling and storage of fish 4, Copenhagen (Denmark), Rome (Italy): FAO, 15 p.

InfoAgro. (2014). Cultivo de lino, www.infoagro.com, 25 de agosto de 2014.

Innis, S.M. (2007). Fatty acids and early human development. *Early human development*, 83 (12), 761-6.

Instituto Nacional de Estadística. (2010). Altas, estancia media, edad media al alta y tasa por 100.000 habitantes, según el sexo y la causa en España (2001). (Actualizado y citado el 5 de abril de 2010). Disponible en: http://www.isciii.es/htdocs/pdf/e01_c.pdf

Instituto Nacional de Estadística. (2010). Defunciones por causa de muerte. (Actualizado y citado el 5 de abril de 2010.) Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path=/t38/p604/a2000/l0/&file=0300002.px&type=pcaxis&L=0>

Ito, T., Murata, H., Tsuda, T., et al. (1999). Effects of α -tocopherol levels in extrusion pellets on in vivo lipid peroxidation levels and antioxidant activities in cultured yellow tail *Seriola quinqueradiata* injected with the causative bacteria of fish jaundice. *Fish Sci.* 65, 679–683.

Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Vidgen, E., Agarwal, S., Rao, A.V., Rosenberg, R.S., Diamandis, E.P., Novokmet, R., Mehling, C.C., Perera, T., Griffin, L.C., Cunnane, B.C. (1999). Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progesterin activity: a controlled crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 395–402.

Jesús Millán Núñez-Cortés, Vicente Lahera Juliá, Manuel Vázquez Carrera y Juan Pedro-Botet (2015). Posición del Comité Español Interdisciplinario de Prevención Cardiovascular sobre las guías de tratamiento de tratamiento de las dislipidemias. *Clin. Invest. Arterioscl.* 27 (1): 34-35.

Jhla, A.J., Hall, L.M. (2010). Flax (*Linum usitatissimum*): current uses and future applications. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 4, 4304-4312.

Jiménez, A. y Gutiérrez, G. (2001). Color. En: Métodos para medir propiedades físicas en la industria de alimentos. Capítulo IV. J.D. Alvarado y J.M. Aguilera. Ed. Acribia. Zaragoza.

Judd, A. (1995). Flax-some historical considerations. In “Flaxseed in Human Nutrition” (L.U. Thompson and S.C. Cunnane, eds.), 2nd Ed., pp. 1–10. AOCS Press, Champaign, IL.

Karatzis, K., Papamichael, C., Karatzis, E., Papaioannou, T.G., Voidonikola, P.T., Vamvakou, G.D., Lekakis, J., Zampelas, A. (2008). Postprandial improvement of

endothelial function by red wine and olive oil antioxidants: a synergistic effect of components of the Mediterranean diet. *J. Am. Coll. Nutr.* 27: 448–453.

Karlström, B.E., Järvi, A.E., Byberg, L., Berglund, L.G., Vessby, B.O. (2011). Fatty fish in the diet of patients with type 2 diabetes: comparison of the metabolic effects of foods rich in n-3 and n-6 fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* Jul.; 94 (1): 26-33.

Kasote, D.M., Badhe, Y.B., Hedge, M.V. (2013). Effect of mechanical press oil extraction processing on quality of linseed oil. *Ind. Crops Prod.* 42, 10 -13.

Khan, M.L., Sharif, M., Sarwar, M., Sameea, M., Ameen, M. (2010). Chemical composition of different varieties of linseed. *Pak. Vet. J.* 2010; 30: 79–82.

Kim, H.Y., Akbar, M., Lau, A., & Edsall, L. (2000). Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (45), 35215-35223.

Konagai, C., Yanagimoto, K., Hayamizu, K., Li, H., Tsuji, T., & Koga, Y. (2013). Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: A randomized controlled trial in healthy elderly volunteers. *Clinical Interventions in Aging*, 8, 1247-1257.

Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106: 2747–2757.

Kris-Etherton, P.M., Yu, S. (1997). Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1628S-1644S.

Kuratko, C.N., Barrett, E.C., Nelson, E.B., Salem, N. Jr. (2013). The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: a review. *Nutrients*. Jul. 19; 5 (7): 2777-810.

Kyriakidis, N.B., & Skarkalis, P. (2000). Fluorescence spectra measurement of olive oil and other vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 83, 1435–1439.

Labarthe, D.R. (1998). Epidemiology and prevention of cardiovascular diseases. A global challenge. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers; 11.

- Laübli, M. and Bruttel, P.A. (1986).** Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method and the Rancimat method. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 63: 792–795.
- Lavie, C.J., Milani, R.V. (1996).** Fish oils. In: Messerli FH, ed. *Cardiovascular Drug Therapy*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1608–1613.
- Lavie, C.J., O’Keefe, J.H., Blonde, L., Gau, G.T. (1990).** High-density lipoprotein cholesterol. Recommendations for routine testing and treatment. *Postgrad. Med.* 87: 36–44, 47, 51.
- Lavie, C.J., Schmieder, R., Genton, E. (1987).** Hemostasis, thrombosis, and antiplatelet agents. *Cardiovasc. Rev. Rep.* 8:25–29.
- Lee, J.H., O’Keefe, J.H., Lavie, C.J., Marchioli, R., & Harris, W.S. (2008).** n-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin. Proc.*, 83 (3): 324-332.
- Lee, J.H., O’Keefe, J.H., Lavie, C.J., Marchioli, R., Harris, W.S. (2008).** Omega-3 for cardioprotection. *Mayo Clin. Proc.* 83: 324–332.
- Lee, J.Y. & Hwang, D.H. (2008).** Dietary fatty acids and eicosanoids. In Chow, C.K., ed. *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 713-739. CRC P ress, London, UK.
- Lee, P.E., Choo, W.S. (2015).** Characterization of flaxseed oil emulsions. *J. Food Sci. Technol.* 52 (7): 4378-4386.
- Lewis-McCrea, L.M. & Lall, S.P. (2007).** Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the development of skeletal abnormalities in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 262, 142–155.
- Leyton, J., Drury, P.J. & Crawford, M.A. (1987).** Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br. J. Nutr.*, 57: 383-393.
- Li, D., Bode, O., Drummond, H. & Sinclair, A.J. (2002).** Omega-3 (n-3) fatty acids. In Gunstone, F.D., ed. *Lipids for functional foods and nutraceuticals*, pp. 225-262, The Oily Press, UK.

- Li, D., Sinclair, A., Wilson, A., Nakkote, S., Kelly, F., Abedin, L. & Watson, A. (1999).** Effect of dietary alpha-linolenic acid on thrombotic risk factors in vegetarian men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69: 872-882.
- Lira-García, C., Souto-Gallardo, M., Bacardí-Gascón, M., Jiménez-Cruz, A. (2008).** Revisión de la efectividad de los ingredientes de productos alternativos para la pérdida de peso (A systematic review of the effectiveness of alternative weight-loss products' ingredients). *Rev. Esp. Salud Pública.* 10, 818-830.
- Lobos Bejarano, J.M., Galve, E., Royo-Bordonada, M.A., Alegría Ezquerro, E., Armario, P., Brotons Cuixart, C., et al. (2015).** Posicionamiento del Comité Español Interdisciplinario de Prevención Cardiovascular y la Sociedad Española de Cardiología en el tratamiento de las dislipemias. Divergencia entre las guías europea y estadounidense. *Clin. Invest. Arterioscl.* 27: 36 – 44.
- Loughrey, K. (2000).** The measurement of Color. En: *Natural food colorants*. Eds.: F.J. Francis, Gabriel, L. Lauro. Ed. Marcer Dekker, Inc. EE.UU.
- Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. (2004).** Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *J. Chromatogr. A.* 1034: 237–242.
- Madrid, A., Cenzano, I. y Vicente, J.M. (1994).** *Nuevo Manual de Industrias Alimentarias*. Ed. A. Madrid Vicente y Mundi-Prensa Libros. Madrid.
- Magalhães, K.F., Caires, A.R.L., Silva, M.S., Alcantra, G.B., Oliveira, S.L. (2014).** Endogenous fluorescence of biodiesel and products thereof: Investigation of the molecules responsible for this effect. *Fuel* 119: 120-128.
- Maiques, A, Morales, M.M., Franch, M., et al. (1995).** Cálculo del riesgo coronario de los pacientes incluidos en el Programa de Actividades Preventivas y de Promoción de la Salud. *Aten. Primaria.* 20: 86–94.
- Malcolmson, L.J., Przybylski, R., Daun, J.K. (2000).** Storage stability of milled flaxseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 235-238.

- Mandasescu, S., Mocanu, V., Dăscalița, A.M., Haliga, R., Nestian, I., Stitt, P.A., Luca, V. (2005).** Flaxseed supplementation in hyperlipidemic patients. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, 109, 502–506.
- Manerba, A., Vizzardì, E., Metra, M., Dei Cas, L. (2010).** n-3 PUFAs and cardiovascular disease prevention. *Future Cardiol.* 6: 343–350.
- Manson, J.E., Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Willet, W.C. (1987).** Body weight and longevity. A reassessment. *JAMA*; 257: 353-8.
- Mantzioris, E., James, M.J., Gibson, R.A. & Cleland, L.G. (1994).** Dietary substitution with an α -linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 1304-1309.
- Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., et al. (2002).** Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105, 1897–1903.
- Marín, R., de la Sierra, A., Armario, P., Campo, C., Banegas, J.R., Gorostidi, M., Sociedad Española de Hipertensión - Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA), (2005).** (2005 Spanish guidelines in diagnosis and treatment of arterial hypertension). *Med. Clin. (Barc.)*. Jun. 4; 125 (1): 24-34.
- Márquez-Ruíz, G., Velasco, J., Dobarganes, C. (2002).** Evaluation of oxidation in dried microencapsulated fish oils by a combination of adsorption and size exclusion chromatography. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 13-18.
- Masala, G., Bendinelli, B., Versari, D., Saieva, C., Ceroti, M., Santagiuliana, F., Caini, S., et al. (2008).** Anthropometric and dietary determinants of blood pressure in over 7000 Mediterranean women: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Florence cohort. *J. Hypertens.* 26: 2112–2120.
- Mata, T. (2009).** “Microalgae for biodiesel production and other applications: A review” *Renewable and Sustainable Energy*. Vol. 14, págs: 217-234.

Mensink, R.P., Katan, M.B. (1992). Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler. Thromb.*; 12: 911-919.

Metherel, A.H., Taha, A.Y., Izadi, H., Stark, K.D. (2009). The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. Nov-Dec.; 81 (5-6): 417-23.

Miller, P.E., Van Elswyk, M., & Alexander, D.D. (2014). Long-chain Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Hypertension*, 27 (7), 885-896.

Ministerio de Sanidad y Consumo (2007). 1ª Conferencia de Prevención y Promoción de la Salud en la Práctica Clínica en España. Prevención Cardiovascular. Editorial Semfyc ediciones. Barcelona.

Mocking, R.J.T., Harmsen, I., Assies, J., Koeter, M.W.J., Ruhe, H.G., & Schene, A. H. (2016). Meta-analysis and meta-regression of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for major depressive disorder. *Translational Psychiatry*, 6 (3), 756.

Morris, D.H. (2001). Essential nutrients and other functional compounds in flaxseed. *Nutr. Today*. 36 (3): 159-162.

Mortalidad por enfermedades cardiovasculares y otras causas. Serie temporal 1989–2002 en España. Madrid: Instituto de Salud Carlos III. (2010). (Actualizado y citado el 5 de abril de 2010). Disponible en: http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/epi_encfcardio_tabla3.jsp

Mourente, G., Bell, G.J. & Tocher, D.R. (2007). Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? *Fish Physiol. Biochem.* 33, 269–280.

Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Ayora-Cañada, M.J. (2005). Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*. 2005; 134: 173–82.

Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., et al. (2012). *Harpers illustrated biochemistry*. 29th ed. New York: McGraw-Hill; 2012.

National Research Council (2011). Nutrient Requirement of Fish and Shrimp. Washington, DC: National Academies Press.

NCEP. (2002). **National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III).** Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III) final report. *Circulation*. Dec. 17; 106 (25): 3143-421.

Nodari, S., Triggiani, M., Campia, U., Manerba, A., Milesi, G., Cesana, B.M., Gheorghide, M., Dei Cas, L. (2011). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57: 870–879.

Núñez-Cortés, J.M., Lahera Juliá, V., Vázquez Carrera, M. y Pedro-Botet, J. (2015). Posición del Comité Español Interdisciplinario de Prevención Cardiovascular sobre las guías de tratamiento de las dislipidemias. *Clin. Invest. Arterioscl.* 27 (1): 34-35.

Nykter, M., Kymalainen, H.R., Gates, F., Sjoberg, A.M. (2006). Quality characteristics of edible linseed oil. *Agric. Food Sci.* 15: 402–13.

Obranović, M., Škevin, D., Kraljić, K., Pospšil, M., Neđeral, S., Blekić, M., Putnik, P. (2015). Influence of climate, varieties and production process on tocopherols, plastocholesterol-8 and pigments in flaxseed oil. *Food Technol. Biotechnol.* in press. <http://www.ftb.com.hr/images/InPress/4252-in%20press.pdf>

Official Methods of Analysis of AOAC International (2005). 18th Ed., AOAC, Gaithersburg.

Ortega Anta, R.M., González Rodríguez, L.G., Cruz, T.K.V., Perea Sánchez, J.M., Vizuete, A.A., & López Sobaler, A.M. (2013). Fuentes alimentarias y adecuación de la ingesta de ácidos grasos omega-3 y omega-6 en una muestra representativa de adultos españoles. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (6), 2236-2245.

- Pan, A., Yu, D., Demark-Wahnefried, W., Franco, O.H., Lin, X. (2009).** Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 90, 288-297.
- Park., P.W., Goins, R.E. (1994).** In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*-Volume 59, No. 6.
- Patade, A., Devareddy, L., Lucas, E.A., Korlagunta, K., Daggy, B.P., Arjmandi, B.H. (2008).** Flaxseed reduces total and LDL cholesterol concentrations in Native American postmenopausal women. *J. Women Health (Larchmt)*, 17, 355–366.
- Pawlosky, R.J., Hibbeln, J.R., Novotny, J.A., et al. (2001).** Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J. Lipid. Res.* 42: 1257-1265.
- Pérez Álvarez, J.A. (1996).** Contribución al estudio objetivo del color en productos cárnicos crudo-curados. Tesis doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. España.
- Pérez Álvarez, J.A., Fernández López, J., Sayas, M.E. y Rosmini, M.R. (1999).** Determinación objetiva del color en los alimentos. *Techno Food*. Vol. 11: 18-28.
- Plaza Pérez, I., Villar Álvarez, F., Mata López, P., et al. (2000).** Control de la colesterolemia en España, 2000. Un instrumento para la prevención cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol.* 53: 815–37.
- Plourde, M., Cunnane, S.C. (2007).** Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32 (4): 619–34.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A. (1995).** Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* 30: 277–90.
- Porter, W.L. (1993).** Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol. Ind. Health* 9, 93-122.

- Poudyal, H., Kumar, S.A., Iver, A., Waanders, J., Ward, L.C., Brown, L. (2013).** Responses to oleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1381-1392.
- Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. y Sinell, H.J. (1994).** Tecnología e higiene de la carne: 743-747.
- Prescha, A., Grajzer, M., Dedyk, M., Grajeta, H. (2014).** The antioxidant activity and oxidative stability of cold-pressed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 1291-1301.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., et al. (2004).** Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 25–39.
- Quaas, M.F., Reusch, T.B.H., Schmidt, J.O., Tahvonen, O., and Voss R. (2016).** It is the economy, stupid! Projecting the fate of fish populations using ecological-economic modeling. *Global Change Biology*, 22, 264-270.
- Raczyk, M., Popis, E., Kruszewski, B., Ratusz, K., Rudzinska, M. (2015).** Physicochemical quality and oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum*) and camelina (*Camelina sativa*) cold-pressed oils from retail outlets. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, in press.
- Rai, P.K., Panda, L.S., Chutia, B.M., et al. (2013).** Comparative assessment of air pollution tolerance index (APTI) in the industrial (Rourkela) and non-industrial area (Aizawl) of India: An eco-management approach. *African Journal of Environmental Science and Technology* 7: 944-948.
- Reddy, S.K., Katan, M.B. (2004).** Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. *Public. Health. Nutr.* 7: 167–186.
- Reglamento (CEE) n° 2568/1991 de la Comisión de 11 de julio de 1991,** relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE n° L248 de 5.9.91).

Reglamento (CEE) nº 796/2002 de la Comisión de 6 de mayo de 2002, por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L128 de 15.5.02).

Reglamento (UE) nº 116/2010, en el Diario Oficial de la Unión Europea el 10 de febrero de 2010.

Reglamento Delegado (UE) 2016/128 de la Comisión de 25 de septiembre de 2015 que complementa el Reglamento (UE) nº 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo.

Report of the British Nutrition Foundation Task Force (1999). n-3 fatty acids and health. The British Nutrition Foundation. Chapman & Hall. New York & London.

Richter, P., Jiménez, M., Salazar, R., Marican, A. (2006). Ultrasound-assisted pressurized solvent extraction for aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons from soils, *J. Chromatogr. A*. 1132: 15–20.

Rodríguez Artalejo, F., Banegas Banegas, J.R., Guallar-Castillón, P. (2001). La mortalidad cardiovascular disminuye, pero los muertos aumentan. *Clin. Invest. Arteriosclerosis*. 13: 68–9.

Rodríguez López, A., Pérez Álvarez, J.A., Sayas Barberá, E., Pagán Moreno, M.J., Gago Gago, M.A. y Aranda Catalá, V. (1992). Colour and colour stability of dry-cured ham. *Proceedings of the 38th ICoMST*. Clermont Ferrand. Vol. 3: 583-586.

Rollefson, G.O., Simmons, A.H., Donaldson, M.L., Gillespie, W., Kafafi, Z., Kohler-Rollefson, I.U., McAdam, E., Ralston, S.L., and Tubb, M.K. (1985). Excavation at the pre-pottery Neolithic B village of 'Ain Ghazal (Jordan), (1983). *Mitteilungen der Deutschen Orient-Gesellschaft zu Berlin* 117, 69–116.

Roszkowska, B., Tańska, M., Czaplicki, S., Konopka, I. (2015). Variation in the composition and oxidative stability of commercial rapessed oils during their shelf life. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 673-683.

- Roth, E.M., Harris, W.S. (2010).** Fish oil for primary and secondary prevention of coronary heart disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 12: 66–72.
- Rubio, M.A., Salas-Salvadó, J., Barbany, M., Moreno, B., Aranceta, J., Bellido, D., Blay, V., Carraro, R., Formiguera, X., Foz, M., de Pablos, P.L., García-Luna, P.P., Griera, J.L., López de la Torre, M., Martínez, J.A., Remesar, X., Tebar, J., Vidal, J. (2007).** Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev. Esp. Obes.*; 5 (3): 135-175.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., M. de Diego, S., Sanz, M.T., Rovira Carballido, J. (2010).** Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11; 1-12.
- Ruíz, E., Ávila, J.M., Valero, T., del Pozo, S., Rodríguez, P., Aranceta-Bartrina, J., ... Varela Moreiras, G. (2015).** Energy Intake, Profile, and Dietary Sources in the Spanish Population: Findings of the ANIBES Study. *Nutrients.* 7 (6), 4739-62.
- Ruíz, E., Ávila, J.M., Valero, T., Del Pozo, S., Rodríguez, P., Aranceta-Bartrina, J., ... Varela-Moreiras, G. (2016).** Macronutrient Distribution and Dietary Sources in the Spanish Population: Findings from the ANIBES Study. *Nutrients.* 8 (3).
- Ruíz-Jiménez, J., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. (2004).** Identification and quantification of trans fatty acids in bakery products by gas chromatography–mass spectrometry after dynamic ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* 1045: 203–210.
- Sampath, H., Ntambi, J.M. (2005).** Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*; 25: 317-340.
- Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A. & Serhan, C.N. (1987).** Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, 237: (4819) 1171-1176.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., et al. (1999).** Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177, 191–199.

Schuchardt, J.P., Schenieder, I., Meyer, H., Neubronner, J., Von Schacky C., & Hahn, A. (2011). Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations – a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids Health Dis.* 10: 145.

Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F. (2002). Oxidative stability of structured lipids produced from borage (*Borago officinalis* L.) and evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils in the docosahexaenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 1003-1014.

Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N. & Kronert, K. (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with anti-inflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.*, 192: 1197-1204.

Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G. & Moussignac, R.L. (2002). Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. *J. Exp. Med.*, 196: 1025-1037.

Shahidi, F., Shukla, V.K.S. (1996). Non-triacylglycerol constituent of fats, oils. *Int. News Fats, Oils Relat. Mater.* 7, 1227- 1232.

Shahidi, F., Wanasundara, U.N. (1995). Oxidative stability of encapsulated seal blubber oil. In *Flavor Technology, Physical Chemistry, Modification and Process*; Ho, C.T., Tan, C.T., Tong, C.T., Eds.; ACS Symposium Series 610; American Chemical Society: Washington, DC, pp. 139-151.

Shaikh, N.A., Yantha, J., Shaikh, S., Rowe, W., Laidlaw, M., Cockerline, C., ... Jackowski, G. (2014). Efficacy of a unique omega-3 formulation on the correction of nutritional deficiency and its effects on cardiovascular disease risk factors in a randomized controlled VASCAZENREVEAL Trial. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 396 (1-2), 9-22.

Shim, Y.Y., Gui, B., Arnison, P.G., Wang, Y., Reanye, M.J.T. (2015). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Tech.* 38, 5-20.

- Simopoulos, A.P., (2002).** The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 365– 379.
- Sinclair, H.M. (1956).** Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, etc. *The Lancet.*, 267 (6919), 381-383.
- Singh, K.K., Mridula, D., Rehal, J., Barnwal, P. (2011).** Flaxseed: A potential source of food, feed and fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51, 210-222.
- Skilton, M.R., Ayer, J.G., Harmer, J.A., Webb, K., Leeder, S.R., Marks, G.B., & Celermajer, D.S. (2012).** Impaired fetal growth and arterial wall thickening: a randomized trial of omega-3 supplementation. *Pediatrics*, 129 (3), 698-703.
- Skulas-Ray, A.C., West, S.G., Davidson, M.H., Kris-Etherton, P.M. (2008).** Omega-3 fatty acid concentrates in the treatment of moderate hypertriglyceridemia. *Expert Opin. Pharmacother.* 9: 1237–1248.
- Smith, W.L., Marnett, L.J. & DeWitt, D.L. (1991).** Prostaglandin and thromboxanes biosynthesis. *Pharmacol. Ther.*, 49: 153-179.
- Squires, D., Vestergaard, N. (2013).** Technical change and the commons. *Review of Economics and Statistics*, 95, 1769–1787.
- Stacpoole, P.W., Aliq, J., Ammon, L., Crockett, S.E. (1989).** Dose-response effects of dietary marine oil on carbohydrate and lipid metabolism in normal subjects and patients with hypertriglyceridemia. *Metabolism*. Oct.; 38 (10): 946-56.
- Stamler, J., Wentworth, D.N., Neaton, J.D. (1986).** Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356.222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*. 256: 2823–8.
- Stitt, P.A. (1994).** History of flax: 9000 years ago to 1986. In “55th Flax Institute of the United States”, pp. 152–153. Fargo, ND.
- Stone, N.J., Robinson, J., Lichtenstein, A.H., Merz, C.N., Blum, C.B., Eckel, R.H., et al., (2014).** American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood

cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 129 (25 Suppl. 2): S1-45.

Szterk, A., Roszlo, M., Sosińska, E. Derewiaka, D. Lewicki, P.P. (2010). Chemical composition and oxidative stability of selected plant oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 637-645.

Tafoya, A. y García Hernández, F. (1993). Colorantes. En: *Biotecnología Alimentaria*. Eds.: García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., y López Munguía, L. Ed. Limusa. México.

Tańska, M., Roszkowska, B., Skarajda, M. and Dabrowski, G. (2016). Commercial Cold Pressed Flaxseed Oils Quality and Oxidative Stability at the Beginning and the End of Their Shelf Life. *J. Oleo. Sci.* 65 (2) 111-121.

The role of the pharmacist in the health care system. Preparing the future pharmacist: curricular development. (1997). Report of the third WHO Consultative Group on the Role of the Pharmacist, Vancouver, Canada, 27-29 August 1997. Geneva: World Health Organization; WHO/PHARM/97/599. Disponible en: <http://www.who.int/medicinedocs/>

Thompson, L.U. (2003). Flaxseed, lignans, and cancer. In “Flaxseed in Human Nutrition” (L.U. Thompson and S.C. Cunnane, eds.), 2nd Ed., pp. 194–218. AOCS Press, Champaign, IL.

Thongson, C., Davidson, P.M., Mahakarnchanakul, W., Weiss, J. (2004). Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Lett. Appl. Microbiol.* 39 (5): 401-6.

Tocher, D.R., Mourente, G., Van der Eecken, A., et al. (2003). Comparative study of antioxidant defense mechanisms in marine fish fed variable levels of oxidized oil and vitamin E. *Aquacult. Int.* 11, 195–216.

Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrason. Sonochem.* 8: 137–142.

Torkan, M., Entezari, M.H., Siavash, M. (2015). Effect of flaxseed on blood lipid level in hyperlipidemic patients. *Rev. Recent Clin. Trials*, 10, 61-67.

Tornabene, T., Ben-Amotz, A. & Hubbard, J. (1982). Isolation, Analysis and Identification of Lipids. *Phycology*. Vol. 21, págs: 71-78.

Troiano, R.P., Frongillo E.A., Jr., Sobal, J., Levitsky, D.A. (1996). The relationship between body weight and mortality: a quantitative analysis of combined information from existing studies. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*; 20: 63-75.

Turatti, J.M. (2000). Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. *Óleos & Grãos*. 56: 20-7.

USDA Nutrient Data Laboratory. (2002). Available at: <http://www.nalusda.gov/fnic/foodcomp/>. Accessed October 3.

Vaisey-Genser, M. and Morris, D. (2003). Introduction: History of the cultivation and uses of flaxseed. In “Flax: The Genus *Linum*” (A. Muir and N. Westcott, eds.), pp. 1–21. Taylor and Francis, Ltd., London, England.

Van Mil, J.W., Schulz, M., Tromp, T.F. (2004). Pharmaceutical care, European developments in concepts, implementation, teaching, and research: a review. *Pharm World Sci. Dec.*; 26 (6): 303–11.

Van Zeist, W. (1972). Palaeobotanical results in the 1970 seasons at Cayonu, Turkey. *Helinium* 12, 3–19. (Cited by Zohary and Hopf, 1993).

Villar Álvarez, F., Banegas Banegas, J.R., Donado Campos, J.M., et al. (2007). Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2007. Madrid: Visto Bueno Equipo Creativo, S.L.

Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D., Mason, T.J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials, *Ultrason. Sonochem.* 4: 135–139.

Von Elbe, J.H. y Schwartz, J.A. (2000). Colorante. En: *Química de los alimentos*. Eds.: Owen, R. Fennema. Ed. Acirbia, S.A. Zaragoza.

Von Elm, E., Altman, D.G., Egger, M., Pocock, S.J., Gøtzsche, P.C., Vandembroucke, J.P. (2008). Declaración de la Iniciativa STROBE (Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology): directrices para la comunicación de estudios observacionales. *Gac. Sanit.*; 22 (2): 144-50.

Wanasundara, U.N., Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem.* 63, 335-342.

Wang, J., Houguo, Xu., Rantao, Z., Kangsen, M., Wei, Xu and Qinghui, Ai. (2016). Effects of oxidized dietary fish oil and high-dose vitamin E supplementation on growth performance, feed utilization and antioxidant defense enzyme activities of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *British Journal of Nutrition*, 115, 1531-1538.

Wiedenamayer, K., Summers, R.S., Mackie, C.A., Gous, A.G.S., Everard, M., Tromp, D. (2006). Desarrollo de la práctica de farmacia. Centrada en la atención del paciente. Ginebra (Suiza): OMS y FIP.

World Health Organization. Expert Committee on Physical Status. (1995). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series n. 854. Geneva: WHO.

Worm, B., Barbier, E., Beaumont, N. et al. (2006). Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 314, 787–790.

Wu, J., Lin, L., Chau, F.T. (2001). Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells, *Ultrason. Sonochem.* 8: 347–352.

Zandomenighi, M., Carbonaro, L., & Caffarata, C. (2005). Fluorescence of vegetable oils: Olive oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 759–766.

Zhang, Z.S., Wang, L.J., Li, D., Li, S.J., Özkan, N. (2011). Characteristics of flaxseed oil from two different flax plants. *Int. J. Prop.* 14, 1286-1296.

Zohary, D. and Hopf, M. (2000). Oil and fiber crops. In “Domestication of Plants in the Old World”. (D. Zohary and M. Hopf, eds.), 3rd Ed., pp. 125–132. Oxford University Press, Oxford.



ANEXOS

ANEXO I:**8.1. MODELO ACUERDO FARMACÉUTICO-PACIENTE****MODELO ACUERDO FARMACÉUTICO-PACIENTE**

El conocimiento de los hábitos alimentarios ayuda al farmacéutico a elaborar los consejos nutricionales más adecuados para mejorar la salud de sus usuarios.

Su colaboración será de gran ayuda para llevar a cabo este proyecto, por lo que expresamos nuestro mayor agradecimiento.

Pero, además, cumplimentar el presente cuestionario le dará la oportunidad de tener un conocimiento de cómo es su dieta, la manera de mejorarla, así como de su estado de salud actual.

El objetivo principal es la detección precoz del colesterol y control de hábitos alimentarios, así como evitar la posibilidad de que aparezcan *Problemas Relacionados con los Medicamentos (P.R.M.)*.

En una primera visita se llevará a cabo un estudio antropométrico. Además, se caracterizarán los hábitos de vida y de alimentación mediante la respuesta a un test y se le realizará una punción capilar para ver sus niveles de colesterol, triglicéridos, glucosa y GPT, también se le medirá la tensión arterial.

De ser seleccionados para la participación en el Ensayo, se llevará a cabo un intervención nutricional en la que se suministrará un suplemento alimenticio omega-3/omega-6 y posteriormente se le realizará de nuevo una punción capilar.

Para la primera entrevista debe traernos los medicamentos que está tomando actualmente, así como aquellos documentos sanitarios que puedan ayudarnos a conocer mejor la razón de su farmacoterapia. Asimismo, deberá avisar al farmacéutico responsable de este servicio ante cualquier modificación en su terapia farmacológica.

La entrevista puede durar unos 15 ó 20 minutos aproximadamente. Conociendo la información más completa sobre su estado de salud podremos ayudarle mejor en futuras modificaciones de su terapia y detectar, si fuese el caso, su estado de malnutrición para poder actuar con diligencia ante el mismo.

Este servicio se ofrece a usuarios de la farmacia, por lo que el trabajo que vamos a hacer no va a tener coste económico alguno para usted, siendo asumido por nosotros el que se pudiera producir.

Nadie le obliga a aceptar este servicio y puede abandonarlo cuando lo desee, por lo que, si cree como nosotros que merece la pena trabajar juntos, nos comprometemos a poner el máximo de nuestra parte, al igual que esperamos también la mayor información por la suya.

D/D^a _____ acepta el ***Servicio de Detección precoz de colesterol y control de hábitos alimentarios*** desde la Oficina de Farmacia, para ayudarle a obtener una mayor calidad de vida y el máximo beneficio de sus medicamentos.

Elche, a ____ de _____ de 20____

Fdo. Paciente:



ANEXO II:

8.2. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FECHA: ____ / ____ / ____

FDO. PACIENTE: _____

ANEXO III:

8.3. ENCUESTA NUTRICIONAL

ENCUESTA NUTRICIONAL

NOMBRE Y APELLIDOS:

DIRECCIÓN:

LOCALIDAD:

PROVINCIA:

CÓDIGO POSTAL:

DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO:

TELÉFONO 1:

TELÉFONO 2:

DATOS SOCIALES

Fecha de nacimiento: ____ / ____ /19 ____

Edad (años):

Peso actual (Kg):

Peso habitual (Kg):

Altura (Cm):

Tensión arterial máxima:

Tensión arterial mínima:

Peso al nacer en (Kg):

En caso de no recordarlo, indique si fue:

PEQUEÑO NORMAL GRANDE

Estado civil:

SOLTERO/A: CASADO/A:

SEPARADO/A:

DIVORCIADO/A:

VIUDO/A:

OTROS (especificar):

SEXO: HOMBRE MUJER

En el caso que Vd. sea mujer, ¿está embarazada? SI NO

¿De cuantas semanas?

¿Está dando el pecho? SI NO

Número de personas que conviven en el domicilio familiar:

¿Padece Vd. alguna enfermedad? SI NO

Especifique cual:

¿Algún miembro de la familia padece o ha padecido alguna enfermedad? SI NO

Si ha contestado SI, especifique quien y cual:

¿Cual es su situación laboral actual?

ESTUDIANTE

En ACTIVO

En PARO

JUBILADO/A

OTROS

Si ha contestado en ACTIVO o en PARO especifique su profesión:

ACTIVIDADES

Indique el número de horas que duerme: _____ horas/día

¿Cuál es la principal actividad que desarrolla a lo largo del día?

Trabajo:

Estudio:

Labores del hogar:

Otras (especificar):

¿Cuál es el número de horas que dedica a su actividad principal? _____ horas/día

TIPO DE VIVIENDA

Chalet individual:

Chalet adosado:

Casa:

Piso:

4 o más habitaciones:

2/3 habitaciones:

1 habitación:

Casa de campo (fuera del núcleo urbano):

Loft:

DATOS SOCIOECONÓMICOS

¿Cuánto tiempo hace que vives en esta población?

_____ AÑOS

_____ MESES

¿Dónde naciste?

POBLACIÓN:

PROVINCIA:

¿Has vivido en otras poblaciones durante 5 o más años? SI NO

Si ha contestado SI especifique:

POBLACIÓN:

PROVINCIA:

POBLACIÓN:

PROVINCIA:

¿Con quién vives la mayor parte del año?

Padres:

Padres y hermanos:

Solo madre:

Solo padre:

Madre y hermanos:

Padre y hermanos:

Abuelos/familiar y hermanos:

Esposo/a e hijos:

Otros (especificar):

¿Cuál es el nivel máximo de estudios alcanzados?

Sin estudios pero lee y escribe:

Estudios primarios incompletos:

Estudios primarios completos:

FP: Formación Profesional (I o II):

Bachiller elemental o ESO:

Bachiller superior o BUP:

Estudios universitarios de grado medio:

Estudios universitarios de grado superior:

¿Cuántas noches a la semana o al mes pasa como media fuera de casa por motivos de trabajo?

Ninguna:

Menos de 1 mes:

1-3/mes:

1-2/semana:

3-4/semana:

5-7/semana:

¿Qué tipo de horario realiza en el trabajo?Media jornada: Jornada partida: Jornada continua de día: Jornada continua de noche: Otros (especificar):

HÁBITOS DIETÉTICOS

¿Quién realiza la compra de los alimentos que se consumen en el hogar? (máximo 2)Yo mismo/a: La madre: El padre: Otro familiar: Empleado/contratado: Otros (especificar): **¿Quién cocina los alimentos que se consumen en el hogar habitualmente? (máximo 2)**

Yo mismo/a:

La madre:

El padre:

Otro familiar:

Empleado/contratado:

Otros (especificar):

¿Tiene horario fijo de comidas?

SI NO

Señale las comidas que realiza al día:

DESAYUNO:

ALMUERZO:

COMIDA:

MERIENDA:

CENA:

OTROS (especificar):

¿Suele picar entre horas?

NUNCA:

A VECES:



TODOS LOS DÍAS:

¿Modifica su alimentación los fines de semana?

SI NO

Si la respuesta es afirmativa, especifique los cambios que realiza:

¿Qué bebidas toma durante las principales comidas? (máximo 2)

Agua:

Vino:

Blanco:

Tinto:

Rosado:

Cerveza:

Refrescos (Coca-cola, Fanta):

Zumo:

Leche:

Otros (especificar):

Mientras come, ¿se distrae de alguna manera? (máximo 2)

No me distraigo:

Veo la T.V.:

Escucho la radio/música:

Me levanto de la mesa:

Estoy conversando en la mesa:

Otros (especificar):

¿A qué hora suele tomar?	ENTRE SEMANA		FIN DE SEMANA	
	HORA	MINUTOS	HORA	MINUTOS
DESAYUNO				
MEDIA MAÑANA				
COMIDA				
MERIENDA				
CENA				

¿Cuánto tiempo suele estar desayunando?

	DIARIO	FIN DE SEMANA
Menos de 10 minutos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10-20 minutos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Más de 20 minutos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Cuánto tiempo suele estar comiendo algo a media mañana?

	DIARIO	FIN DE SEMANA
Menos de 10 minutos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10-20 minutos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Más de 20 minutos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Cuál es su comida preferida?

- 1.
- 2.

¿Tiene alergias o intolerancias a algún alimento?

SI NO

Si ha contestado SI especifique cuales:

- 1.
- 2.

¿Cree que su conocimiento de nutrición es?

Excelente:

Bueno:

Regular:

Malo:

Durante su comida:

Suele repetir:

Se lo come todo pero no repite:

Se deja comida en el plato:

CONSUMO DE AGUA

¿Utiliza habitualmente agua potable (del grifo)?

SI NO

Si ha contestado SI: ¿Qué cantidad? (en vasos/día):

¿Utiliza habitualmente agua mineral (de botella)?

SI NO

Si ha contestado SI: ¿Qué cantidad? (en vasos/día):

¿Bebe?

En las comidas: SI NO

Durante la actividad física: SI NO

Solo cuando tiene sed: SI NO

Fuera de las comidas: SI NO

¿Consume algún tipo de bebida isotónica o energética durante el día?

SI NO

Si ha contestado SI, ¿cuál o cuales?

¿Qué cantidad? (especifica envase):

CONSUMO DE ACEITE, GRASAS Y DULCES

¿Qué tipo de aceite consume para aliñar ensaladas/verduras? (máximo 2)

No consume:

Aceite de oliva virgen extra:

Aceite de oliva:

Aceite de semillas (soja, girasol, maíz, coco, palma):

Salsas preparadas:

Otros (especificar):

¿Qué tipo de grasa utiliza en casa para cocinar o freír? (máximo 2)

No consume:

Aceite de oliva virgen extra:

Aceite de oliva:

Aceite de semillas (soja, girasol, maíz, coco, palma):

Mantequilla:

Margarina:

Manteca de cerdo:

Otros (especificar):

¿Qué tipo de grasa utiliza para extender el pan? (máximo 2)

No consume:

Aceite de oliva virgen extra:

Aceite de oliva:

Otros aceites:

Mantequilla:

Margarina:

Otros (especificar):

¿Qué tipo de dulces consume habitualmente? (máximo 2)

No consume:

Galletas:

Bollería industrial:

Chocolates:

Turrón:

Otros (especificar):

CONSUMO DE SAL

¿Añade normalmente sal a sus comidas o ensaladas?

SI:

NO:

A VECES:

¿Sueles echar más sal a sus comidas o ensaladas?

SI:

NO:

CONSUMO DE HUEVOS/SEMANA

NO CONSUME:

1 UNIDAD:

2 UNIDADES:

3 UNIDADES:

OTRA CANTIDAD (especificar):

CONSUMO DE PAN, CEREALES Y SIMILARES

¿Qué tipo de pan consume habitualmente?

No utiliza:

	desayuno	comida	cena	bocadillo	otros
--	----------	--------	------	-----------	-------

Pan normal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan integral	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan de molde	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan tostado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros (especificar):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Qué tipo de patatas y cereales consume habitualmente? (máximo 2)

No consume:

Patatas fritas:

Patatas cocidas:

Patatas asadas:

Otros (especificar):



¿Qué tipo de cereales consume habitualmente? (máximo 2)

No consume:

Pasta:

Pizza:

Arroz:

Otros (especificar):

CONSUMO DE LÁCTEOS

¿Qué tipo de lácteos consume? (máximo 2)

No consume:

Leche entera:

Leche semidesnatada:

Leche desnatada:

Yogur:

Natillas:

Queso:

Helado:

Otros (especificar):

CONSUMO DE CARNE

¿Qué tipo de carne consume más? (máximo 2)

No consume:

Carne de vacuno:

Carne de cerdo:

Carne de pollo:

Carne de cordero:

Otros (especificar):

CONSUMO DE PESCADO

¿Qué tipo de pescado consume más? (máximo 2)

Pescado blanco (máximo 2)

No consume:

Merluza:

Pescadilla:

Lenguado:

Salmonete:

Otros (especificar):

Pescado azul (máximo 2)

No consume:

Sardina:

Atún:

Boquerón:

Caballa:

Emperador:

Salmón:

Otros (especificar):



Crustáceos (máximo 2)No consume: Sepia: Calamar: Almejas: Mejillones: Gambas: Otros (especificar):

CONSUMO DE VERDURAS

¿Consume verduras?SI NO **¿Cuántas raciones de verduras o puré de verduras 100% puro comió ayer en el desayuno?**Ninguna: Menos de 1: 1: 2: 3:

4:

5 o más:

¿Cuántas raciones de verduras o puré de verduras 100% puro comió ayer en la comida?

Ninguna:

Menos de 1:

1:

2:

3:

4:

5 o más:



¿Cuántas raciones de verduras o puré de verduras 100% puro comió ayer en la cena?

Ninguna:

Menos de 1:

1:

2:

3:

4:

5 o más:

¿Cuántas raciones de verduras o puré de verduras 100% puro comió ayer entre comidas?

Ninguna:

Menos de 1:

1:

2:

3:

4:

5 o más:

CONSUMO DE FRUTAS

¿Consume frutas?

SI NO

¿Cuántas unidades de frutas o zumo de frutas 100% puro tomó ayer en el desayuno?

Ninguna:

Menos de 1:

1:

2:

3:

4:

5 o más:

¿Cuántas unidades de frutas o zumo de frutas 100% puro tomó ayer en la comida?

Ninguna:

Menos de 1:

1:

2:

3:

4:

5 o más:



¿Cuántas unidades de frutas o zumo de frutas 100% puro tomó ayer en la cena?

Ninguna:

Menos de 1:

1:

2:

3:

4:

5 o más:

¿Cuántas unidades de frutas o zumo de frutas 100% puro tomó ayer entre comidas?

Ninguna:

Menos de 1:

1:

2:

3:

4:

5 o más:

CONSUMO DE BEBIDAS

¿Consume habitualmente vino o cerveza durante las principales comidas?

VINO: SI NO

CERVEZA: SI NO

OTROS (especificar): SI NO

CONSUMO DE ESTIMULANTES/SUPLEMENTOS

¿Toma algo para ayudarle en su rendimiento o mejora de salud?

No tomo:

	HABITUALMENTE	OCASIONALMENTE
--	---------------	----------------

Café:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Té:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ginseng:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preparados específicos deportivos (nombre y cantidad/día):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vitaminas (nombre y cantidad/día)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Si ha contestado OTROS, especificar nombre y cantidad/día:

¿Toma suplementos de Omega 3 y Omega 6 a través de?

Alimentación

Huevos:

Leche:

Cápsulas:

Yogures:

No tomo suplementos:

Si ha contestado a través de **cápsulas** especifique nombre y cantidad/día:

¿Con qué frecuencia consume cápsulas de Omega 3 y Omega 6?

No consume:

Más de 6 meses/año:

Entre 6 y 3 meses/año:

Menos de 3 meses/año:

CONSUMO DE TABACO

¿Fuma?

SI NO

Número de cigarrillos al día:

¿Fuma alguien con quién convive o con el que tenga contacto de forma habitual?

SI NO

Número de horas en contacto con humo: Horas/día:

OBSERVACIONES:

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

ANEXO IV:

8.4. TEST DE CUMPLIMIENTO TERAPÉUTICO Y CONOCIMIENTO DE LOS FÁRMACOS**CÓDIGO PACIENTE**

--	--	--

TEST DE CUMPLIMIENTO TERAPÉUTICO Y CONOCIMIENTO DE LOS FÁRMACOS**1. Prueba de Morisky - Green**

Valora la actitud del paciente ante el cumplimiento terapéutico:

¿Olvida alguna vez tomar los medicamentos?	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
¿Toma los medicamentos a la hora indicada?	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
¿Cuándo se encuentra bien deja de tomar la medicación?	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Si alguna vez le sienta mal, ¿deja usted de tomarla?	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

Se considera no cumplidor si se observa un incumplimiento en cualquiera de las preguntas realizadas en la prueba.

2. Preguntas sobre el conocimiento de los fármacos y necesidad de ayuda.

¿Sabe para qué toma sus medicamentos?	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> ALGUNOS <input type="checkbox"/>
¿Necesita ayuda para preparar su medicación?	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>



ANEXO V:

8.5. HOJA DE MEDICACIÓN DEL PACIENTE

CÓDIGO PACIENTE

--	--	--

HOJA DE MEDICACIÓN DEL PACIENTE

Patología	Medicación	Posología			PRM	Fecha inicial	Fecha final	Alerta al médico	Problema resuelto
		Desayuno	Comida	Cena					
				Antes de acostarse					

P.R.M.: Problemas relacionados con los medicamentos

ANEXO VI:

8.6. HOJA DE PUNCIÓN CAPILAR PRE-POST INTERVENCIÓN CON CÁPSULAS OMEGA-3

CÓDIGO PACIENTE

--	--	--

PUNCIÓN CAPILAR PRE-POST INTERVENCIÓN
(AYUNAS)

Nombre y apellidos:.....

Tratamiento realizado: *(a cumplimentar por la UMH)*GRUPO 1: GRUPO 2: GRUPO 3:

PUNCIÓN CAPILAR TRAS EL TRATAMIENTO

PUNCIÓN CAPILAR TRAS EL TRATAMIENTO	
FECHA DEL ANÁLISIS:	
PESO REAL:	
ALTURA:	
COLESTEROL:	
TRIGLICÉRIDOS:	
GLUCOSA:	
GPT:	
PRESIÓN ARTERIAL MÁXIMA:	
PRESIÓN ARTERIAL MÍNIMA:	
PULSO:	
ICC	
CIRCUNFERENCIA CINTURA	
CIRCUNFERENCIA CADERA	

ANEXO VII:

8.7. HOJA DE PUNCIÓN CAPILAR PRE-POST INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON SEMILLA DE LINO

CÓDIGO PACIENTE

--	--	--

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PRE-POST
INTERVENCIÓN (AYUNAS)

Nombre y apellidos:.....

Edad:

Fecha del análisis:

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS			
PRUEBA	RESULTADO	UNIDADES	VAL. REFERENCIA
Glucosa (sangre):		mg/dL	74-106
Triglicéridos (sangre):		mg/dL	0-150
Colesterol Total:		mg/dL	0-200
Colesterol HDL:		mg/dL	40-60
PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS	RESULTADO		
Peso real:			
Altura:			
Presión Arterial Máxima:			
Presión Arterial Mínima:			
Pulso:			
Circunferencia cintura:			
Circunferencia cadera:			

VAL.: Valor

ANEXO VIII:

8.8. DIETA



FARMACIA IBORRA

DIETA

FÓRMULA DIETÉTICA: 1.900-2000 Kcal

Proteínas: 12-15% VET	69-70g
Grasas: 35%	78-82g
Colesterol:	< 300g
Carbohidratos:50-55 VET	262-288g
Fibra: 15g/1000Kcal	30g
Sales minerales:	Mejora aportes K, Ca, Fe, Zn
Vitaminas:	Valores normales
Agua: 1mL/Kcal	Mínimo: 2L/día

TÉCNICAS DE COCCIÓN	
ACONSEJADAS	OCASIONALMENTE
Cocción al vapor, hervido o escalfado	Frituras
Al vapor	Rebozados
A la plancha	Empanados
Al horno o papillote	Guisos
Al agua cocido o hervido	Estofados

OTROS ASPECTOS CULINARIOS:

- Condimentos: **Suaves y aromáticos. Evitar los picantes y fuertes que pueden alterar la flora intestinal y crean hábito. Usar hierbas aromáticas con potencial carminativo (comino, hinojo, anís verde). Moderar la sal y preferir la marina. No abusar del azúcar.**
- Grasa de condimentos: **recomendar los aceites vegetales, y sobre todo el aceite de oliva tanto para aliñar como para guisar.**
- Temperatura: **la que corresponda gastronómicamente. Los líquidos fríos y calientes aumentan el peristaltismo intestinal.**

IMPORTANTE:

- **Pesarse todas las SEMANAS el mismo día, una vez iniciada la dieta.**
- **Caminar 1 hora diaria.**
- **Beber de 1,5L a 2L de agua DIARIOS.**
- **Duración de la dieta y tratamiento 4 SEMANAS.**

DESAYUNO A ELEGIR

DESAYUNO 1:

- Café (2g) o descafeinado con leche desnatada (100g)
- Media tostada (30g) con pavo frío (50g)
- 4-5 ciruelas secas (50g)

DESAYUNO 2:

- 1 zumo de naranja (100g)
- Media tostada integral (30g) con dulce dietético (mermelada light) (30g)
- 4-5 ciruelas secas (50g)

DESAYUNO 3:

- Café (2g) o descafeinado con leche desnatada
- Media tostada (50g) con tomate (50g)
- 1 kiwi (110g)

MEDIA MAÑANA:

1 cítrico (150g) 1 infusión que pueden ser 150 mL de café que se preparan con 2g de café soluble aproximadamente. Su valor nutritivo es inapreciable. Suponen una media de 105 mg de cafeína en el natural y 2 mg para el descafeinado.

MERIENDA:

Elegir entre:

Yogur desnatado (125g), leche desnatada (100g), zumo de pomelo (125g)

Menú 1

Almuerzo:

- Lentejas (50g) con verdura (70g)
- Filete de pavo (100g) plancha. Judías verdes hervidas (50g)
- 1 kiwi (150g)

Cena:

- Lenguado (120g)
- Calabacín plancha (10g)
- 1 yogur desnatado (125g)

Menú 2

Almuerzo:

- 1 plato de puré de patata (200g), puerro (50g) y cebolla (50g) con leche desnatada (150g) y un quesito (10g) bajo en grasa.
- 1 rodaja de Merluza (110g) al horno con zanahoria (50g), guisantes (30g), cebolla (10g)
- 1 naranja (150g)

Cena:

- Cogollo de lechuga con 4 espárragos (50g) blancos
- 1 lomo de bacalao fresco (120g)
- 1 ración de piña

Menú 3

Almuerzo:

- 1 cuenco de sopa con fideos
- Filete de pollo (100g) plancha. Champiñón (100g) rehogado con ajo 1 tomate (50g)
- 1 manzana

Cena:

- 1 filete de emperador (120g) plancha. Judías verdes (50g) hervidas con patata (200g)

Menú 4

Almuerzo:

- Alcachofas (4 unidades) con patata (200g)
- Filete de ternera (100g) Medio cogollo lechuga (50g) con remolacha (50g)
- 1 pera (120g)

Cena:

- Acelgas (20g) hervidas.
- Rape o pescado blanco (120g) con judías verdes hervidas (50g)
- 1 kiwi (150g)

Menú 5

Almuerzo:

- 1 plato de arroz (5g) 3 delicias o arroz con pisto (tomate(50g), cebolla(30g), pimiento (50g) o calabacín (50g))
- Medio cogollo de lechuga (50g) con 1 unidad de pepino (40g)
- Yogur desnatado (125g)

Cena:

- Rodaja de salmón (120g)
- Lechuga (50g) y tomate (50g)
- Ciruelas secas (50g) (5 unidades)

Menú 6

Almuerzo:

- 1 plato de garbanzos (40g) con espinacas (150g)
- 1 filete de pechuga de pollo (100g) con 1 tomate (50g)
- 1 kiwi (150g)

Cena:

- Hervido de patata (200g) con puerro (50g)
- 3 unidades de salmonetes, zanahoria (50g) rallada (2 unidades)
- 1 ración de piña (150g)

Menú 7

Almuerzo

- 1 plato de arroz (5g) con atún (100g) y tomate (50g).
- Ensalada de lechuga (50g), tomate (50g), zanahoria (50g)
- 1 kiwi (150g)

Cena:

- Rodaja de merluza (110g). Ensalada de escarola (50g). 1 manzana

VERDURAS EQUIVALENTES

Berenjena
Brócoli
Champiñones/setas
Espárragos verdes

EQUIVALENTES A LA ESCAROLA

Achicoria
Apio
Berro
Endivias
Lechuga

EQUIVALENTES CARNES EXTRA MAGRAS

Jamón cocido magro/york (2 lonchas finas 30g)
Filete de pollo
Solomillo de buey
Solomillo de ternera

PESCADOS EQUIVALENTES

BLANCO	AZUL
Bacalao fresco	Trucha
Besugo	Salmón
Lenguado	Caballa
Lubina	Boquerones (6 unidades)
Merluza	Sardina mediana (4 unidades)
Mero	
Rape	
Dorada	
Gallo	

ANEXO IX:

8.9 TARJETA DE SEGUIMIENTO



FARMACIA IBORRA

DATOS DE IDENTIFICACIÓN:
Nombre:
Código paciente:

SEGUIMIENTO INTERVENCIÓN NUTRICIONAL

	DURANTE TTO.	1 ^a REVISIÓN	2 ^a REVISIÓN	3 ^a REVISIÓN	4 ^a REVISIÓN
FECHA					
PESO					

ANEXO X:

8.10. LISTADO DE PUBLICACIONES

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1-García, V., Micol, V., Cerdán, M., Gallar, M., Roche, E., García, E. **Control del grado de oxidación de suplementos Omega-3 en stocks de diferentes establecimientos.** *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2011; 31 (supl.1):107-108

2-García, V., Díez, P., Micol, V., Gallar, M., Roche, E., García, E. **Servicio de detección precoz de colesterol a usuarios de Oficina de Farmacia.** *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2011; 31 (supl.1):108

3-García, Vanessa; Gallar, Manuel; Vicedo, Ángela; Sánchez, Ignacio; Roche, Enrique; García, Elena. **Evaluación de Hábitos Alimentarios en Oficina de Farmacia y Otros Establecimientos.** *Revista Española de Nutrición Comunitaria (Spanish Journal of Community Nutrition)* 2012; 18 (supl.3):50

4-García, Vanessa; Gallar, Manuel; Micol, Vicente; Sánchez-Soriano, Joaquín; Roche, Enrique; García, Elena. **Diferente grado de oxidación en cápsulas omega 3/6: repercusión en el perfil lipídico en hombres.** *Revista Española de Nutrición Comunitaria (Spanish Journal of Community Nutrition)* 2012; 18 (supl.3):60

5-García, Vanessa; Gallar, Manuel; Micol, Vicente; Barraojón-Catalán, Enrique; Roche, Enrique; García, Elena. **Grado de Oxidación: respuesta de distintos aceites en el stock de Oficinas de Farmacias y otros establecimientos.** *Revista Española de Nutrición Comunitaria (Spanish Journal of Community Nutrition)* 2012; 18 (supl.3):60

6-García Hernández, V.M.; Carbonell Barrachina, A.; Sánchez Soriano, J.; Roche, E.; García-García, E. **Estudio de aceptabilidad en un grupo de usuarias de Oficina de Farmacia de cereales para desayuno formulados con omega-3.** *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2014; 34 (supl. 1):260-261

7-García Hernández, V.; Carbonell Barrachina, A.; Sánchez Soriano, J.; Roche, E.; García-García, E. **Estabilidad oxidativa de aceites de semillas de lino en diferentes formas de presentación, utilizando el método de Rancimat.** *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2014; 34 (supl. 1):259-260

8-García Hernández, V.; Carbonell Barrachina, A.; Sánchez Soriano, J.; Roche, E.; García-García, E. **Repercusión del consumo de cereales formulados con omega-3 en la salud de usuarias: innovando desde la Oficina de Farmacia.** *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2014; 34 (supl. 1):275

9-García Hernández, V.; Valero, L.; Botella, B.; Sánchez-Soriano, J.; Roche, E.; García-García, E. **Evaluación del consumo de alimentos a usuarias de Oficina de Farmacia tras un estudio de intervención.** *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2014; 34 (supl. 1):108

10-**García Hernández, V.M.**; Iborra Campos, M.A.; Micol Molina, V.; Roche Collado, E.; García-García, E. **Últimos avances en actividades sanitarias dirigidas a la población desde Oficina de Farmacia: Investigación en nutrición.** 24 de octubre de 2014.

11-**García-Hernández, V.M.**; Barber i Vallés, X.; Sanchis Selfa, M.; Iborra Campos, M.A.; Roche Collado, E.; García-García, E. **Posible correlación entre parámetros antropométricos y bioquímicos en usuarios vs usuarias de Oficina de Farmacia con el uso de medicamentos.** *Revista Nutrición Clínica en Medicina* 2015; *Vol XI -Nº1- Marzo: 115-116*

12-**García-Hernández, V.M.**; Barber i Vallés, X.; Sanchis Selfa, M.; Iborra Campos, M.A.; Roche Collado, E.; García-García, E. **Frecuencia de consumo de diferentes tipos de pan en usuarios/as de Oficina de Farmacia con perfil lipídico alterado.** *Revista Nutrición Clínica en Medicina* 2015; *Vol XI -Nº1- Marzo: 116*

13-**García-Hernández V.M.**; Carbonell-Barrachina A.A.; Sánchez-Soriano J.; Roche E.; García-García E. **Extracción de aceite de semilla de lino en diferentes tipos de marcas comerciales.** *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2016; *36 (supl. 1):52*

14-**García-Hernández V.M.**; Bolufer C.; Lorenzo M.L.; Olea F.; Barber X.; García-García E. **Desarrollo de un protocolo para la prevención y control de perfil lipídico desde “Oficina de Farmacia”.** *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2016; *36 (supl. 1):120*

15- **García-Hernández V.M.**; Sánchez-Soriano J.; Iborra-Campos M.A.; Roche E.; García-García E. **Efecto del consumo de semilla de lino con yogur sobre factores de riesgo cardiovascular en mujeres adultas con alteraciones leves en perfil lipídico.** *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 2016; *36 (supl. 1):126*

PUBLICACIONES

1-**García-Hernández, V.M, Gallar, M., Sánchez-Soriano, J., Micol, V., Roche E., and García-García, E. (2013).** Effect of omega-3 dietary supplements with different oxidation levels in the lipidic profile of women: a randomized controlled trial. *Int J Food Sci Nutr.* 64(8): 993-1000.

2-**García-Hernández, V.M.; Hojjati, M., Carbonell-Barrachia, A.A.; Sánchez-Soriano, J.; Roche, E.; García-García, E. (2017).** Comparison of soxhlet and ultrasound methods for oil extraction from Spanish flaxseeds. **ENVIADA**

3- **García-Hernández, V.M, Sánchez-Soriano, J., Iborra Campos, M.A.; Roche E., and García-García, E. (2013).** Effect of flaxseed consumption together with a fish-enriched diet in circulating lipids of hyperlipidemic women: a randomized controlled trial. ENVIADA





DIPLOMA ACREDITATIVO DE LA FUNDACIÓN ICOMEM PARA LA EDUCACIÓN Y FORMACIÓN SANITARIAS



Mediante el presente Diploma, certifico que

D./D^a. García, V.; Micol, V.; Cerdán, M.; Gallar, M.; Roche, E.; García, E.

Han participado mediante la PRESENTACION DE LA COMUNICACIÓN:

CONTROL DEL GRADO DE OXIDACIÓN DE SUPLEMENTOS OMEGA-3 EN STOCKS DE DIFERENTES ESTABLECIMIENTOS en las

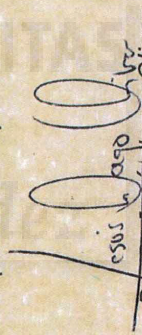
XV JORNADAS NACIONALES DE NUTRICIÓN PRÁCTICA

VII CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluido en el PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA de este Ilustre Colegio, celebrado en Madrid, los días 30, 31 de marzo y 1 de abril de 2011, con una duración de 21 horas lectivas y acreditado por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid, núm. de expediente 10-8018, con un total de 2,3 créditos.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 1 de abril de 2011.




D. D. Jesús Lago Oliver

Director de la Fundación ICOMEM
para la Educación y Formación sanitarias



SIDA Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación

SPRIM
HEALTH MARKETING & COMMUNICATION



DIPLOMA ACREDITATIVO DE LA FUNDACIÓN ICOMEM PARA LA EDUCACIÓN Y FORMACIÓN SANITARIAS



Mediante el presente Diploma, certifico que

D./D^a. García, V.; Díez, P.; Micol, V.; Gallar, M.; Roche, E.; García, E.

Han participado mediante la PRESENTACION DE LA COMUNICACION:

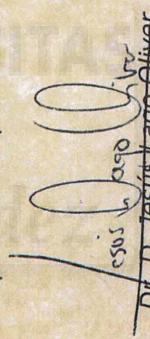
SERVICIO DE DETECCIÓN PRECOZ DE COLESTEROL A USUARIOS DE OFICINA DE FARMACIA en las

XV JORNADAS NACIONALES DE NUTRICIÓN PRÁCTICA VII CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluido en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebrado en Madrid, los días 30, 31 de marzo y 1 de abril de 2011, con una duración de **21 horas lectivas** y acreditado por la **Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid**, núm. de expediente 10-8018, con un total de **2,3 créditos**.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 1 de abril de 2011.




Dr. D. Jesús Lago Oliver

Director de la Fundación ICOMEM
para la Educación y Formación sanitarias



**Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación**





La Nutrición Comunitaria en el Bicentenario de la Constitución Española. Cádiz 2012

IX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN COMUNITARIA SENC

Cádiz, 7-10 de noviembre de 2012 - Edificio "Constitución 1812"

www.nutricioncomunitaria.org

Comité organizador

Presidenta:

- Amelia Rodríguez Martín

Secretarios:

- José Pedro Novalbos Ruiz
- José Manuel Martínez Nieto

Tesorero:

- Antonio Barba Chacón

Miembros:

- Tomás Arencibia Rivero
- Antonio Ares Camerino
- Juan Bosco López Sáez
- M.ª Luisa Castilla Romero
- Luis Escobar Jiménez
- Inmaculada Failde Martínez
- M.ª Teresa Fernández del Barrio
- Antonia López Sánchez
- José Ramón Lorenzo Peñuelas
- Miguel Macías Benítez
- M.ª José Santi Cano
- Juan José Silva Rodríguez

Comité científico

Presidentes:

- Javier Aranceta Bartrina
- Lluís Serra Majem

Miembros:

- Manuel Aguilar Diosdado
- José Luis Lechuga Campoy
- Fernando López Fernández
- Emilio Martínez de Vitoria Muñoz
- Rosa M.ª Ortega Anta
- Carmen Pérez Rodrigo
- Joan Quiles Izquierdo
- Gemma Salvador i Castell
- José Juan Vallo de Castro
- Carmina Wandenberghé
- Juan Zafra Mezcuá

Organiza

SENC
SOCIEDAD
ESPAÑOLA
NUTRICIÓN
COMUNITARIA



Colabora

UCA
Universidad
de Cádiz

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

Certificamos que los autores:

García, Vanessa; Gallar, Manuel; Vicedo, Angela; Sáchez, Ignacio;
Roche, Enrique; García, Elena

han presentado el PÓSTER titulado:

"EVALUACIÓN DE HÁBITOS ALIMENTARIOS EN OFICINA DE FARMACIA Y OTROS ESTABLECIMIENTOS"

en el **IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria** celebrado en Cádiz, los días 7, 8, 9 y 10 de noviembre de 2012

Y para que así conste a los efectos oportunos

Dr. Javier Aranceta Bartrina
Presidente del Comité Científico
Presidente SENC

Dra. Amelia Rodríguez Martín
Presidenta del Comité Organizador
IX Congreso SENC



La Nutrición Comunitaria en el Bicentenario de la Constitución Española Cádiz 2012

IX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN COMUNITARIA SENC

Cádiz, 7-10 de noviembre de 2012 - Edificio "Constitución 1812"

www.nutricioncomunitaria.org

Comité organizador

Presidenta:

- Amelia Rodríguez Martín

Secretarios:

- José Pedro Novalbos Ruiz
- José Manuel Martínez Nieto

Tesorero:

- Antonio Barba Chacón

Miembros:

- Tomás Arencibia Rivero
- Antonio Ares Camerino
- Juan Bosco López Sáez
- M.ª Luisa Castilla Romero
- Luis Escobar Jiménez
- Inmaculada Failde Martínez
- M.ª Teresa Fernández del Barrio
- Antonia López Sánchez
- José Ramón Lorenzo Peñuelas
- Miguel Macías Benítez
- M.ª José Santi Cano
- Juan José Silva Rodríguez

Comité científico

Presidentes:

- Javier Aranceta Bartrina
- Lluís Serra Majem

Miembros:

- Manuel Aguilar Diosdado
- José Luis Lechuga Campoy
- Fernando López Fernández
- Emilio Martínez de Vitoria Muñoz
- Rosa M.ª Ortega Anta
- Carmen Pérez Rodrigo
- Joan Quiles Izquierdo
- Gemma Salvador i Castell
- José Juan Vallo de Castro
- Carmina Wandenberghé
- Juan Zafra Mezcuá

Organiza

SENC
SOCIEDAD
ESPAÑOLA
NUTRICIÓN
COMUNITARIA



Colabora

UCA
Universidad
de Cádiz

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

Certificamos que los autores:

García, Vanessa; Gallar, Manuel; Micol, Vicente; Sánchez-Soriano, Joaquín; Roche, Enrique; García, Elena

han presentado el PÓSTER titulado:

"DIFERENTE GRADO DE OXIDACIÓN EN CÁPSULAS OMEGA 3/6: REPERCUSIÓN EN EL PERFIL LIPÍDICO EN HOMBRES"

en el **IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria** celebrado en Cádiz, los días 7, 8, 9 y 10 de noviembre de 2012

Y para que así conste a los efectos oportunos

Dr. Javier Aranceta Bartrina
Presidente del Comité Científico
Presidente SENC

Dra. Amelia Rodríguez Martín
Presidenta del Comité Organizador
IX Congreso SENC



La Nutrición Comunitaria en el Bicentenario de la Constitución Española Cádiz 2012

IX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN COMUNITARIA SENC

Cádiz, 7-10 de noviembre de 2012 - Edificio "Constitución 1812"

www.nutricioncomunitaria.org

Comité organizador

Presidenta:

- Amelia Rodríguez Martín

Secretarios:

- José Pedro Novalbos Ruiz
- José Manuel Martínez Nieto

Tesorero:

- Antonio Barba Chacón

Miembros:

- Tomás Arencibia Rivero
- Antonio Ares Camerino
- Juan Bosco López Sáez
- M.ª Luisa Castilla Romero
- Luis Escobar Jiménez
- Inmaculada Failde Martínez
- M.ª Teresa Fernández del Barrio
- Antonia López Sánchez
- José Ramón Lorenzo Peñuelas
- Miguel Macías Benítez
- M.ª José Santi Cano
- Juan José Silva Rodríguez

Comité científico

Presidentes:

- Javier Aranceta Bartrina
- Lluís Serra Majem

Miembros:

- Manuel Aguilar Diosdado
- José Luis Lechuga Campoy
- Fernando López Fernández
- Emilio Martínez de Vitoria Muñoz
- Rosa M.ª Ortega Anta
- Carmen Pérez Rodrigo
- Joan Quiles Izquierdo
- Gemma Salvador i Castell
- José Juan Vallo de Castro
- Carmina Wandenberghé
- Juan Zafra Mezcuá

Organiza

SENC
SOCIEDAD
ESPAÑOLA
NUTRICIÓN
COMUNITARIA



Colabora

UCA
Universidad
de Cádiz

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

Certificamos que los autores:

García, Vanessa; Gallar, Manuel; Micol, Vicente; Barrajón-Catalán, Enrique; Roche, Enrique; García, Elena

han presentado el PÓSTER titulado:

"GRADO DE OXIDACIÓN: RESPUESTA DE DISTINTOS ACEITES EN EL STOCK DE OFICINAS DE FARMACIA Y OTROS ESTABLECIMIENTOS"

en el **IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria** celebrado en Cádiz, los días 7, 8, 9 y 10 de noviembre de 2012

Y para que así conste a los efectos oportunos

Dr. Javier Aranceta Bartrina
Presidente del Comité Científico
Presidente SENC

Dra. Amelia Rodríguez Martín
Presidenta del Comité Organizador
IX Congreso SENC

Secretaría Técnica: MASTERCONGRESOS, S. L.

c/ Ramón y Cajal, 5 28100 Alcobendas (Madrid) · Tel. 91 662 46 50 · Fax: 91 661 50 06 · e-mail: senc2012@mastercongresos.com · www.senc2012.com



DIPLOMA ACREDITATIVO DEL ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE MADRID



Mediante el presente Diploma, certifico que

GARCÍA HERNÁNDEZ, V. M., CARBONELL BARRACHINA, A., SÁNCHEZ SORIANO, J., ROCHE, E., GARCÍA GARCÍA, E.

Han participado mediante la **PRESENTACIÓN DE LA COMUNICACIÓN:**

“ESTUDIO DE ACEPTABILIDAD EN UN GRUPO DE USUARIAS DE OFICINA DE FARMACIA DE CEREALES PARA DESAYUNO FORMULADOS CON OMEGA-3”, en las

XVIII JORNADAS NACIONALES DE NUTRICIÓN PRÁCTICA Y IX CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluidas en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebradas en Madrid, los días 19, 20 y 21 de marzo de 2014 con una duración de **21 horas lectivas**.

Esta actividad docente (con nº de expediente **13-10333**), está acreditada por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid-Sistema Nacional de Salud, con **2,3 créditos** de formación continuada para las profesiones: Medicina, Farmacia, Biología, Enfermería, Bioquímica (Esp. San.), Química Esp. San., Nutrición y Diet., Tec. Superior en Dietética y Tec. Superior en Salud Amb.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 21 de marzo de 2014.



SE
Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación


Dra. D.ª Ana Isabel Sánchez Atrio
Vicepresidenta del Ilustre Colegio
Oficial de Médicos de Madrid



SPRIM
HEALTH MARKETING & COMMUNICATION



DIPLOMA ACREDITATIVO DEL ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE MADRID



Mediante el presente Diploma, certifico que

GARCÍA HERNÁNDEZ, V.M., CARBONELL BARRACHINA, A., SÁNCHEZ SORIANO, J., ROCHE, E., GARCÍA GARCÍA, E.

Han participado mediante la **PRESENTACIÓN DE LA COMUNICACIÓN:**

“ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITES DE SEMILLAS DE LINO EN DIFERENTES FORMAS DE PRESENTACIÓN UTILIZANDO EL MÉTODO DE RANCIMAT”, en las

XVIII JORNADAS NACIONALES DE NUTRICIÓN PRÁCTICA Y IX CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluidas en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebradas en Madrid, los días 19, 20 y 21 de marzo de 2014 con una duración de **21 horas lectivas**.

Esta actividad docente (con nº de expediente **13-10333**), está acreditada por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid-Sistema Nacional de Salud, con **2,3 créditos** de formación continuada para las profesiones: Medicina, Farmacia, Biología, Enfermería, Bioquímica (Esp. San.), Química Esp. San.), Nutrición y Diet., Tec. Superior en Dietética y Tec. Superior en Salud Amb.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 21 de marzo de 2014.



**Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación**



Dra.ª Ana Isabel Sánchez Atrio
Vicepresidenta del Ilustre Colegio
Oficial de Médicos de Madrid



SPRIM
HEALTH MARKETING & COMMUNICATION



DIPLOMA ACREDITATIVO DEL ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE MADRID



Mediante el presente Diploma, certifico que

GARCÍA HERNÁNDEZ, V.M., CARBONELL BARRACHINA, A., SÁNCHEZ SORIANO, J., ROCHE, E., GARCÍA GARCÍA, E.

Han participado mediante la **PRESENTACIÓN DE LA COMUNICACIÓN:**

“REPERCUSIÓN DEL CONSUMO DE CEREALES FORMULADOS CON OMEGA-3 EN LA SALUD DE USUARIAS: INNOVANDO DESDE LA OFICINA DE FARMACIA”, en las

XVIII JORNADAS NACIONALES DE NUTRICIÓN PRÁCTICA Y IX CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluidas en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebradas en Madrid, los días 19, 20 y 21 de marzo de 2014 con una duración de **21 horas lectivas**.

Esta actividad docente (con nº de expediente **13-10333**), está acreditada por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid-Sistema Nacional de Salud, con **2,3 créditos** de formación continuada para las profesiones: Medicina, Farmacia, Biología, Enfermería, Bioquímica (Esp. San.), Química Esp. San.), Nutrición y Diet., Tec. Superior en Dietética y Tec. Superior en Salud Amb.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 21 de marzo de 2014.



SFO
Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación



Dra. D. Ana Isabel Sánchez Atrio
Vicepresidenta del Ilustre Colegio
Oficial de Médicos de Madrid



SPRIM
HEALTH MARKETING & COMMUNICATION



DIPLOMA ACREDITATIVO DEL ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE MADRID



Mediante el presente Diploma, certifico que

GARCÍA HERNÁNDEZ, V., VALERO, L., BOTELLA, B., SÁNCHEZ SORIANO, J., ROCHE, E., GARCÍA GARCÍA, E.

Han participado mediante la **PRESENTACIÓN DE LA COMUNICACIÓN:**

“EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE ALIMENTOS A USUARIAS DE OFICINA DE FARMACIA TRAS UN ESTUDIO DE INTERVENCIÓN”, en las

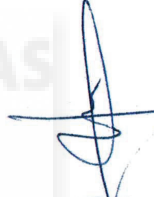
XVIII JORNADAS NACIONALES DE NUTRICIÓN PRÁCTICA Y IX CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluidas en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebradas en Madrid, los días 19, 20 y 21 de marzo de 2014 con una duración de **21 horas lectivas**.

Esta actividad docente (con nº de expediente **13-10333**), está acreditada por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid-Sistema Nacional de Salud, con **2,3 créditos** de formación continuada para las profesiones: Medicina, Farmacia, Biología, Enfermería, Bioquímica (Esp. San.), Química Esp. San.), Nutrición y Diet., Tec. Superior en Dietética y Tec. Superior en Salud Amb.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 21 de marzo de 2014.





Dra. Ana Isabel Sánchez Atrio
Vicepresidenta del Ilustre Colegio
Oficial de Médicos de Madrid




**Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación**




SPRIM
HEALTH MARKETING & COMMUNICATION



OF-16

CERTIFICA QUE:

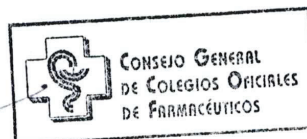
García Hernández VM, Iborra Campos MA, Micol MolinaV, Roche Collado E, García-García E

Han presentado el trabajo

ÚLTIMOS AVANCES EN ACTIVIDADES SANITARIAS DIRIGIDAS A LA POBLACIÓN DESDE OFICINA DE FARMACIA: INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN

en la modalidad de **COMUNICACIÓN PÓSTER**

Córdoba, 24 de octubre de 2014



Ana M^a Aliaga Pérez
Secretaria General del Consejo General
de Colegios Oficiales de Farmacéuticos

3^{er} CONGRESO FESNAD

SEVILLA 5_7 MARZO 2015

Alimentación y Nutrición: Necesidad Global



III Congreso FESNAD

Del 5 al 7 marzo de 2015, Sevilla

Sra. Dña. Vanessa Matilde García Hernández

Ha presentado en el III Congreso FESNAD, celebrado en el Hotel Barceló Sevilla Renacimiento los días 5, 6 y 7 de marzo de 2015, el trabajo en formato PÓSTER titulado **“Posible correlación entre parámetros antropométricos y bioquímicos en usuarios vs usuarias de oficina de farmacia con el uso de medicamentos”** con los siguientes autores: García Hernández, Vanessa Matilde; Barber i Vallés, Xavier; Sanchís Selfa, Marina; Iborra Campos, María Asunción; Roche Collado, Enrique; García García, Elena.

Dr. Pedro Pablo García Luna
Presidente del Comité Organizador

Sevilla, 7 de marzo de 2015

Dr. Federico Casimiro-Soriguer Escofet
Presidente del Comité Científico

3^{er} CONGRESO FESNAD

SEVILLA 5_7 MARZO 2015

Alimentación y Nutrición: Necesidad Global



III Congreso FESNAD

Del 5 al 7 marzo de 2015, Sevilla

Sra. Dña. Vanessa Matilde García Hernández

Ha presentado en el III Congreso FESNAD, celebrado en el Hotel Barceló Sevilla Renacimiento los días 5, 6 y 7 de marzo de 2015, el trabajo en formato PÓSTER titulado “**Frecuencia de consumo de diferentes tipos de pan en usuarios/as de oficina de farmacia con perfil lipídico alterado**” con los siguientes autores: García Hernández, Vanessa Matilde; Barber i Vallés, Xavier; Sanchís Selfa, Marina; Iborra Campos, María Asunción; Roche Collado, Enrique; García García, Elena.

Dr. Pedro Pablo García Luna
Presidente del Comité Organizador

Sevilla, 7 de marzo de 2015

Dr. Federico Casimiro-Soriguer Escofet
Presidente del Comité Científico



DIPLOMA ACREDITATIVO DEL ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE MADRID



Mediante el presente Diploma, certifico que

**GARCÍA-HERNÁNDEZ VM, CARBONELL-BARRACHINA AA, SÁNCHEZ-SORIANO J,
ROCHE E, GARCÍA-GARCÍA E**

Han participado mediante la **PRESENTACIÓN DE LA COMUNICACIÓN:**

“EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLA DE LINO EN DIFERENTES TIPOS DE MARCAS COMERCIALES”

en las

XX JORNADAS DE NUTRICIÓN PRÁCTICA Y X CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluidas en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebradas en Madrid,
los días 13, 14 y 15 de Abril de 2016 con una duración de **18,5 horas lectivas**.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 15 de Abril de 2016.



Ba-Sonia Lázaro Masedo
Presidenta del Comité Organizador

SPRIM

SJA
Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación





DIPLOMA ACREDITATIVO DEL ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE MADRID



Mediante el presente Diploma, certifico que

GARCIA-HERNÁNDEZ VM, BOLUFER C, LORENZO ML, OLEA F, BARBER X, GARCÍA-GARCÍA E

Han participado mediante la **PRESENTACIÓN DE LA COMUNICACIÓN:**

**“DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL
DEL PERFIL LIPÍDICO DESDE “OFICINA DE FARMACIA””**

en las

XX JORNADAS DE NUTRICIÓN PRÁCTICA Y X CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

incluidas en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebradas en Madrid,
los días 13, 14 y 15 de Abril de 2016 con una duración de **18,5 horas lectivas**.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 15 de Abril de 2016.



Ba Sonia Lázaro Masedo
Presidenta del Comité Organizador

SPRIM

SJA
Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación





DIPLOMA ACREDITATIVO DEL ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE MADRID



Mediante el presente Diploma, certifico que

GARCÍA-HERNÁNDEZ VM, SÁNCHEZ- SORIANO J, IBORRA- CAMPOS MA, ROCHE E, GARCÍA-GARCÍA E

Han participado mediante la **PRESENTACIÓN DE LA COMUNICACIÓN:**

**“EFECTO DEL CONSUMO DE SEMILLA DE LINO CON YOGUR SOBRE FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR
EN MUJERES ADULTAS CON ALTERACIONES LEVES EN PERFIL LIPÍDICO”**

en las

**XX JORNADAS DE NUTRICIÓN PRÁCTICA
Y X CONGRESO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA**

incluidas en el **PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA** de este Ilustre Colegio, celebradas en Madrid,
los días 13, 14 y 15 de Abril de 2016 con una duración de **18,5 horas lectivas**.

Y para que conste, firmo el presente Diploma en Madrid, a 15 de Abril de 2016.



Sonia Lázaro Masedo
Presidenta del Comité Organizador

SPRIM

SJA Sociedad Española de Dietética
y Ciencias de la Alimentación



RESEARCH ARTICLE

Effect of omega-3 dietary supplements with different oxidation levels in the lipidic profile of women: a randomized controlled trial

V. M. García-Hernández¹, M. Gallar², J. Sánchez-Soriano³, V. Micol⁴, E. Roche^{1,5}, and E. García-García¹

¹Department of Applied Biology-Nutrition and Institute of Bioengineering, Miguel Hernandez University, Elche, Alicante, Spain, ²Department of Nursing, University of Alicante, Alicante, Spain, ³Center of Operative Research and ⁴Institute of Molecular and Cell Biology, Miguel Hernandez University, Elche, Alicante, Spain, and ⁵CIBERobn (Physiopathology of Obesity and Nutrition CB12/03/30038), Instituto de Salud Carlos III, Spain

Abstract

The oxidation level of omega-3 fatty acid supplements commercialized in capsules may be a risk to consumers' health. For this purpose, we have designed a single-blind, parallel-group, randomized controlled trial in which 52 women participated. Volunteers were randomly distributed into three groups consuming: (1) less oxidized oil pills, (2) highly oxidized oil pills and (3) no capsules. All groups consumed a fish-rich diet. Circulating glucose, total cholesterol, triglycerides and glutamic pyruvic transaminase were determined at the beginning and end (30 days) of the study. As a result, the ingestion of less oxidized ω -3 supplements reduced circulating triglyceride and cholesterol levels, as opposed to the highly oxidized omega-3 capsules, which had a negative effect on cholesterol levels. In conclusion, the level of oxidation of the supplements is a key factor in controlling circulating lipid profile. Therefore, manufacturers must pay attention to the quality of the prime product prior to encapsulation.

Keywords

Blood cholesterol, blood lipid profile, commercial pills, fish oil, lipid peroxidation, triglycerides

History

Received 19 February 2013

Revised 7 May 2013

Accepted 4 June 2013

Published online 11 July 2013

Introduction

The consumption of dietary supplements based on polyunsaturated fatty acids (PUFAs) is becoming increasingly popular in Western societies. Overweight people and those with excess levels of circulating cholesterol are the primary targets of the companies that commercialize these products. In this context, several recent studies have evidenced a reduction of circulating triglycerides (TG) after consumption of omega-3 (ω -3) fatty acids in the form of either capsules or fish-enriched diets in individuals with different physiopathological situations (Mickleborough et al., 2003; Ooi et al., 2012; Peters et al., 2012; Zhang et al., 2012). However, fish oil consumption does not only reduce the circulating levels but also the composition of TG fatty acids from a saturated to a polyunsaturated profile (Browning et al., 2012; Ottestad et al., 2012; Zhang et al., 2012). Nevertheless, controlled trials are very heterogeneous in their experimental designs, producing in some cases modest results (EFSA, 2005). However, the small beneficial effect observed in these studies seemed to be sufficient to restore the circulating lipid profile of the volunteers to healthy levels.

Fish oil is the most extended primary ingredient to manufacture in the form of pills (Rique-Marie et al., 1998). However, its composition varies greatly depending on several factors, including fish species, sea environment, gender and season (Harris, 1996). The commercial interest of fish oils is that they contain relatively high concentrations of long chain n-3 or ω -3 PUFAs from which eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n3) and docosahexaenoic acid

(DHA, C22:6n3) are the most prominent (Higdon et al., 2000; Hirai et al., 1989).

Scientific evidence shows that EPA and DHA consumption can have beneficial effects by reducing the risk of cardiovascular disease (Song et al., 2000). However, once extracted from the animal, fish oils are very susceptible to undergo *in vitro* oxidations, resulting in undesirable flavours that can cause the consumer's rejection (Kolanowski et al., 2007). The intake of oxidized fats in the form of pills allows the oxidized fatty acids to be consumed while avoiding consumer rejection. In order to prevent further fatty acid oxidation and extend the product's half-life, the manufacturers add synthetic antioxidants and vitamin E (EFSA, 2005).

Fat oxidation is a key point in consumer's health, because evidence indicates that dietary oxidized fats can contribute to the development of atherosclerosis and thrombosis (Hayashi et al., 1998; Kris-Etherton et al., 2003). In addition, various studies attribute the presence of adverse effects to the consumption of stale fats, because they contain highly reactive and toxic substances that can modify proteins, nucleic acids and other biomolecules *in vivo* (Kim et al., 2001; Kromhouth et al., 1985). In addition, the methylene groups positioned between *cis* double bonds present in PUFAs are highly reactive to oxidizing compounds, favouring organic free-radical formation and oxidized-by-products with significant pro-oxidant potential among biological compartments (Marnett, 1999).

Considering all of the above, we conducted this study to report the influence of different supplements according to the degree of oxidation on circulating cholesterol and TG levels of female consumers. Particularly, we tested the following hypothesis: (1) If consumption of ω -3 dietary supplements would improve the lipid profile of the consumers and (2) if the level of oxidation of the PUFAs contained in pills would affect the efficacy of the

Correspondence: Elena García García, Instituto de Bioingeniería (edificio Vinalopó), Universidad Miguel Hernández, Avda. de la Universidad s/n, 03202-Elche, Alicante, Spain. Tel: +34 965 222 005. Fax: +34 966 658 511. E-mail: egarcia@umh.es

dietary supplements. Likewise, as a preparatory objective of our study, we tested whether the level of oxidation of ω -3 dietary supplements was due to the manufacturing process or, on the contrary, to the storage time or conditions (Moher et al., 2010; Schulz, 2010).

Materials and methods

Determination of oil oxidation parameters

For this study, we chose 16 commercially available fish oil brands in Elche (Spain) distributed in pharmacies and health shops. Once in the laboratory, samples were protected from light and humidity, and maintained at room temperature mimicking commercial stocking conditions during 6 months. Oxidation parameters were determined in triplicate at the beginning and after every month of storage, which included peroxide index and UV absorbance (K_{232} , K_{270} and K_{280}), both following the analytical methods described in European Economic Commission (EEC) Regulation 2.598/91, relative to the characteristics of olive oils and subsequent amendments (EC Regulation 796/2002 and 1989/2003 of the European Commission).

Briefly, peroxide index determination was performed in 2 g of oil samples dissolved in 10 mL of chloroform and 15 mL of glacial acetic acid. A saturated solution of KI (1 mL) was added, vigorously mixed for 30 s and kept in the dark for 5 min. After the addition of 75 mL of distilled H_2O , the final mixture was titrated with 0.1 M Na-thiosulphate until its yellow colour disappeared. Finally, 0.5 mL of 0.05% starch indicator was added. Titration continued until the blue colour disappeared. A blank with no oil was titrated under similar conditions. Peroxide index was expressed as milliequivalents of active oxygen per kg of sample (meq/oil kg). The reagents used were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and JT Baker (Deventer, Holland).

Ultraviolet (UV) absorbance was determined at 232, 270 and 280 nm, respectively, in an UV spectrophotometer (Beckman Coulter™ DU® Series 520, Palo Alto, CA). Oil samples (40 mg) were diluted in 50 mL of 1% cyclohexane (Sigma-Aldrich). Flasks were closed with glass plugs and stirred in a vortex to obtain a homogeneous mixture. The mixture was placed in a cuvette with a 1 cm optical path, and K_s (molar extinction coefficients) at 232, 270 and 280 nm were measured using cyclohexane as blank. Three washes with cyclohexane were performed between each determination. Samples were measured in triplicate for each wavelength. The K value was calculated according to $K_\lambda = A/C \cdot P$, where λ is the wavelength, A is the absorbance lecture in the spectrophotometer at the corresponding λ , C is the oil concentration in the solvent (g/100 mL) and P is the cuvette optical path. The final K_λ value results from the mean of three independent determinations.

Study of consumption of fish oil pills

Participants

The participant recruitment process began in October 2010. The intervention was carried out in February 2011 and lasted 30 d, with a subsequent monitoring of participants, which ended in April 2011. Participant flow diagram is indicated in Figure 1. Data from 71 subjects was processed by an initial battery of tests consisting of three brief questions concerning age, presence of currently high circulating cholesterol and TG levels as well as intake of prescribed medication to control the levels, in order to select the individuals that met the selection criteria for the study. Eligible participants ($n=57$) were all women aged between 25 and 75 years who met the inclusion criteria of dyslipidemia with no indication of drug treatment, with blood cholesterol levels ranging 250–300 mg/dL and TG 160–175 mg/dL. Exclusion

criteria were pregnancy and lactation, participation in another supplementary feeding program, and cholesterol and TG levels over 300 and 175 mg/dL, respectively. According to these criteria, a total of 25 women were excluded. The location where the women were recruited for the study was a pharmacy located in the city centre of Elche. Elche is an industrial city located in the southeast of Spain, with a population of 230 000 inhabitants.

Selected patients ($n=57$) who agreed to participate in the study, signed a written consent. The study was approved by the Ethics Committee of University Miguel Hernandez (Reference number: DBA-EGG-001-12). Volunteers were monitored by a survey on dietary intake and provided by a follow-up form for possible incidents and a non-compliance form if they wished to abandon the study. Anthropometric parameters, including weight, height and waste/hip ratio were assessed on-site at the pharmacy office. In addition, blood pressure measurements (mmHg) were taken with a blood pressure monitor, according to current regulations provided by the European Society of Hypertension (Guidelines Committee, 2003), that is, the patients were allowed to rest for 5 min before measuring, were placed sitting in an upright position with back support and legs in a 90° angle and making an average of two measurements separated by a 1-min interval. Cardiovascular risk indicators such as glucose, cholesterol, triglyceride and glutamic pyruvic transaminase (GPT) levels were measured in capillary blood with a Rapid Control Gauge on a Reflotron® Plus by Roche desktop analyser with serial number 5072278 (Barcelona, Spain). Fasting blood samples were obtained by capillary puncture between 9 and 11 AM, at the beginning (Day 0) and end (Day 30) of the study.

Trial design

The assignment of women to distinct groups was carried out following the classification criteria established by (NCEP, 2002), and performed by the research team. Women were randomly assigned to one of three parallel groups, in a near 1:1:1 ratio. Group 1 ($n=20$) took two capsules per day of less oxidized oil (containing 300 mg EPA + DHA per capsule) and diet. Group 2 ($n=17$) consumed two capsules per day of oxidized oil (containing 300 mg EPA + DHA per capsule) and diet. Finally, group 3 ($n=18$) performed the diet but did not take any capsule. Therefore, the design was a single-blind (participants did not know what type of capsule they were receiving), parallel-group, randomized controlled trial conducted at the Miguel Hernández University of Elche (Spain).

Intervention

During a 1-month intervention period, all participants attended face-to-face training sessions, receiving instruction manuals that included a personal sample meal plan, recipes and information regarding physical activity. Body weight (kilogram), height (centimetre) and blood pressure (millimetre Hg) were currently measured under standard conditions. The energy intake of the diet designed for hypercholesterolemia was similar in the three groups (ranging 1900–2000 Kcal per day). The meal planning included seven different daily options, the macronutrient distribution is indicated in Table 1. Each meal option contained a dish of fish distributed as follows: Day 1: 120 g of sole for dinner, Day 2: 115 g of hake for lunch + 115 g of cod for dinner, Day 3: 120 g of swordfish for dinner, Day 4: 120 g of monkfish for dinner, Day 5: 120 g of salmon for dinner, Day 6: 250 g of mullets for dinner and Day 7: 105 g of tuna for lunch + 105 g of hake for dinner. Daily intakes of EPA and DHA from diet are reported in Table 1. The daily energy expenditure was estimated according to Harris–Benedict equation.

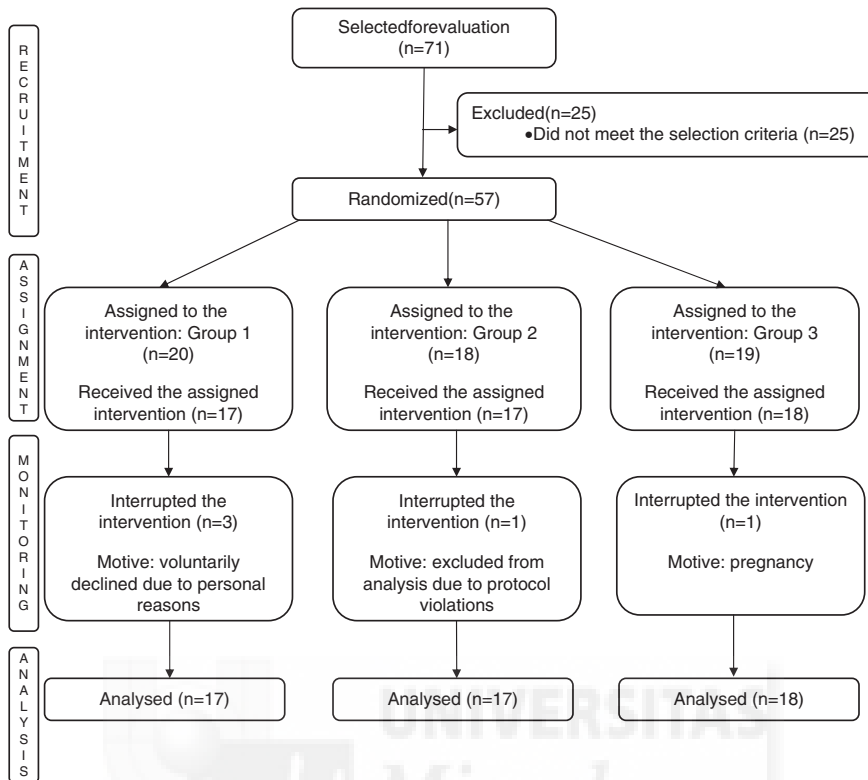


Figure 1. Participant flow diagram.

Table 1. Characteristics of the hypocholesterolemic daily diet administered to volunteers.

Total energy: 1900–2000 Kcal	
Proteins: 12–15% of the total energy	69–70 g
Fats: 35% of the total energy	78–82 g
	EPA: 0.11–1.35 g
	DHA: 0.11–0.72 g
Cholesterol	<300 g
Carbohydrates: 50–55% of the total energy	262–288 g
Fiber: 15 g/1000 Kcal	30 g
Minerals	Improved input in K, Ca, Fe, Zn
Vitamins	Normal values
Water: 1 mL/Kcal	2 L/d minimum

Stopping guidelines

The only rule considered to cease the study was related to the sample size (see below). If the number of valid observations decreased drastically with respect to the reasonable number of observations to obtain statistically significant results, the study would be stopped. In addition, a particular woman could be excluded from the study, after being included in the trial, for the following reasons: protocol violations ($n=1$ in group 2), voluntarily declined due to personal reasons ($n=3$ in group 1) and pregnancy during the study ($n=1$ in group 3) (Figure 1).

Theoretical estimation for sample size

As we were interested in detecting sensitive variations in each of the variables measured of the lipid profile within each group after

1 month following the supplement intake and dietary instructions, we considered a big (Cohen) effect size ($d=1$), with a two-sided 5% significance level and a power of 80%. This allowed obtaining a sample size of around 16 women per group. On the other hand, to detect sensitive variations in each of the variables under study between the three groups, considering again a big (Cohen) effect size ($f=0.5$), with a 5% significance level and a power of 80%, we obtained less than 17 women per group. This also held for the secondary variables. The number of volunteers at the end of the study fitted with these theoretically calculated values: $n=17$ for group 1, $n=17$ for group 2 and $n=18$ for group 3.

For the analysis of the quality of the ω -3 dietary supplements, the standard deviation within each brand was very small (~ 0.005). Therefore, two observations were only required from each brand to estimate the pairwise differences between the means to within ± 0.05 with 95% confidence, assuming Tukey's honestly significant difference (HSD). However, three observations from each group were obtained.

Statistical methods

Statistical analysis was carried out using STATGRAPHICS Centurion XV software (StatPoint Technologies, Inc. Warrington, VA); likewise, significance was defined at $p \leq 0.05$. Data are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Intragroup statistical comparisons were performed using the following hypothesis tests, both parametric and non-parametric: t -test, sign test and signed rank test for paired samples. Intergroup statistical comparisons were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) and the Kruskal–Wallis hypothesis tests. Also, Fisher's least significant difference (LSD)

Multiple Range Test and Tukey's HSD were used in order to determine which means were significantly different from the others.

Methods for additional analyses

Generalized multiple regression was used to statistically analyse the relationships between the variations in the lipid profile and the consumption of ω -3 dietary supplements.

Results

Outcomes

The main objective of the study was to assess the effect of taking ω -3 dietary supplements (oxidized versus non-oxidized) and diet on blood cholesterol, triglycerides, glucose and GPT levels after 1 month. The secondary objective was to assess the effect of taking ω -3 dietary supplements (oxidized versus non-oxidized) and diet on weight (kilogram), body mass index (BMI in kilogram per square metre), hip/waste (centimetre) ratio, systolic pressure (millimetre Hg) and diastolic pressure (millimetre Hg).

Likewise, as it was necessary to analyse the quality of the ω -3 dietary supplements, we considered as a first endpoint to determine the oxidation degree of different commercial brands by measuring peroxide indexes and Ks at 232, 270 and 280 nm during 6 months of storage, in order to know the possible cause of oxidation of encapsulated oils.

Oxidation parameters determined in commercial fish oils

Table 2 shows the EPA + DHA contents and peroxide indexes of the 16 brands of fish oil-based dietary supplements analysed in the study. EPA and DHA contents varied greatly among the different brands. In addition, some of these products, in particular brands 3, 5, 7, 9, 10 and 15, did not show information regarding the amount of ω -3 fatty acids present in the pills. Regarding the peroxide index determined at the moment of acquisition, we observed three groups. The first group included the brands with the lowest values of peroxide index (>20 meq/oil kg), corresponding to brands 2, 4 and 15. A second group consisted in the brands with the highest values of peroxide indexes (<75 meq/oil kg), including brands 10 and 13. The remaining

Table 2. EPA + DHA content reported by the manufacturer, peroxide index (mean \pm SEM) and Ks groups (see Figure 2) of all fish oil dietary supplements derived from different brands analysed in this study [ANOVA (Tukey HSD)].

Brand	EPA + DHA (mg)	Peroxide index (meq/oil kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₈₀
1	105 + 75	38.12 \pm 1.44 ^d	F	I	H
2	32 + 49	16.98 \pm 1.94 ^f	D	E–F	F–G
3	–	40.79 \pm 2.39 ^d	C	B	B
4	175 + 125	15.10 \pm 1.02 ^f	G	C	C
5	–	27.76 \pm 0.07 ^e	G	B	B
6	30 + 35	27.48 \pm 0.32 ^e	A	A	A
7	–	28.83 \pm 1.30 ^e	B	B	B
8	34 + 32	46.90 \pm 1.36 ^c	E	H	H
9	–	47.21 \pm 0.59 ^c	D	F–G	H
10	–	93.21 \pm 3.08 ^a	H	J	I
11	180 + 120	47.67 \pm 0.08 ^c	E	G	G
12	357 + 143	40.95 \pm 2.43 ^d	I	D	E
13	11.3 + 6.1	78.97 \pm 0.70 ^b	G	C	D
14	21 + 14	38.62 \pm 0.19 ^d	I	K	J
15	–	19.69 \pm 0.81 ^f	B	C	C–D
16	90 + 60	39.17 \pm 0.51 ^d	G	E	E–F

The ANOVA (Tukey HSD) allows to establish 5 groups (superindex: a–f) with significant differences ($p < 0.05$) for peroxide index.

brands presented intermediate peroxide levels ranging between 27.48 (brand 6) and 47.67 (brand 11) meq/oil kg.

K₂₃₂ corresponds to the presence of conjugated hydroperoxides (initial lipid oxidation by-products) and was mostly, but not necessarily related to the peroxide index previously determined. K₂₇₀ and K₂₈₀ indicate the presence of pentanal, hexanal, hydroxynonenal and malondialdehyde (terminal lipid oxidation by-products) in the corresponding oil samples. The determination of K₂₃₂ allowed to separate the 16 oil supplements into nine groups (Figure 2A), 11 groups for K₂₇₀ (Figure 2B) and 10 groups for K₂₈₀ (Figure 2C).

The values of K₂₃₂, K₂₇₀ and K₂₈₀ also were varied (Table 2). The majority of the brands presented moderate (brands 1, 8, 9, 11 and 16) or low (brands 3, 6 and 7) levels of all oxidation by-products. The other brands presented moderate levels of conjugated hydroperoxides and low levels of end-products (brand 5), or high levels of conjugated hydroperoxides and moderate levels of oxidation end-products (brand 12). Brand 14 exhibited the highest values for all oxidation by-products. In any case, K determinations must be considered with caution, as other substances added to the supplement, which may not necessarily be lipid oxidation by-products, could present UV absorption in the same wavelengths. The lack of information regarding the exact oil composition did not allow us to reach a clear conclusion.

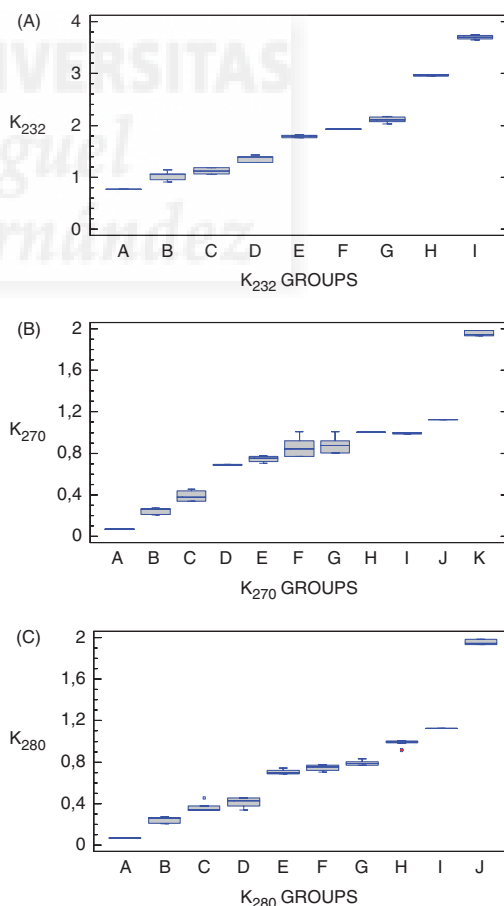


Figure 2. Box plot for the three molar extinction coefficients (Ks) measured in the 16 capsule brands: K₂₃₂ (A), K₂₇₀ (B) and K₂₈₀ (C).

However, the data indicate that the peroxide index could be the most accurate index to assess oil oxidation.

All brands presented similar peroxide index after 6 months (not shown) compared to time 0, indicating that the quality of the initial product rather than storage conditions was the main determinant in the oxidation of encapsulated oils. This observation can be explained by the use of antioxidants in the moment of encapsulation. The majority of the brands, when indicated, reported the addition vitamin E (ranging from 0.5 to 10 mg/capsule) and some of them (five brands) used vitamins A (ranging from 375 to 1500 µg/capsule) and D (ranging from 0.2 to 10 µg per capsule).

Study of consumption of fish oil pills

In total, 52 women accepted to collaborate in this study (Figure 1). Participants were randomly and double-blind distributed into three groups: group 1 ($n=17$), group 2 ($n=17$) and group 3 ($n=18$). The distribution was performed in a way that all groups had similar clinical characteristics (Tables 3 and 4). Oil capsules derived from brands 4 and 11 were selected for consumption as they presented very similar amounts of EPA + DHA (300 mg) (Table 2), but different degrees of oil oxidation, being brand 4 less oxidized than brand 11 (Table 2). Group 1 took two capsules per day of brand 4, group 2 took two capsules per day of brand 11 and group 3 did not take capsules during a period of 30 days. All groups followed the same fish-rich diet (Table 1).

Intergroup comparisons applying the ANOVA with just one factor resulted in non-significant differences in glycaemia, as opposed to cholesterol which was significantly decreased in group 1 (which consumed less oxidized oil), while group 2 (which consumed more oxidized oil) presented the highest values (Table 4). Intragroup comparisons showed a significant increase in circulating glucose only for group 1 (consuming less oxidized oil) but ranking into normoglycaemic values (Table 4). TG levels decreased significantly in the three groups of intervention (Table 4). There were no statistically significant changes in the values of GPT (Table 4). Finally, systolic and diastolic pressure

levels decreased in group 1 (consuming less oxidized oil), whereas no significant differences were observed in the other two groups (Table 3).

By applying the model of general regression, the only parameter that varied among the groups was the circulating cholesterol, as observed in the intragroup analysis. Thus, the intervention with capsules had more impact than the intervention only with diet. Next, we proceeded to perform a simple regression analysis by assigning to the less oxidized oil (brand 4) a value of -1 , to diet a value of 0 and for the more oxidized oil (brand 11) a value of $+1$. A 0.41 correlation coefficient was obtained between the changes in circulating cholesterol and the consumption of oil capsules, indicating that the intake of the capsules could explain in 16.89% the variation of cholesterol in an individual, being this modest relationship statistically significant ($p=0.0025$). In addition, we deduced that the short-term intervention with capsules + diet had a better causal effect on cholesterol levels than only diet. This correlation was positive as more oxidized oil consumption significantly increased circulating cholesterol levels and less oxidized oil consumption significantly reduced circulating cholesterol levels. We thus concluded that consumption of capsules containing oxidized oil may have an opposite effect than what the product claims, at least during the 30-d period of the study.

It must be mentioned that the blood pressure rates recommended for an adequate control of hypertension are 140–90/90–60 mmHg and our measurements of systolic blood pressure oscillated between the margins of 118.2 ± 0.45 to 129.9 ± 0.50 mmHg ($p < 0.05$) for systolic blood pressure while diastolic blood pressure measurements oscillated between 77.2 ± 0.26 and 68.9 ± 0.21 mmHg. Moreover, the literature confirms that increases of 20 mmHg in systolic blood pressure and 10 mmHg in diastolic blood pressure above normal levels for the population double the risk of death due to cardiovascular disease.

Finally, no adverse reaction was observed in any of the groups that consumed these supplements. Only some participants ($n=3$) experienced a fishy acid reflux, which is one of the warnings listed on the package insert for these supplements.

Table 3. Anthropometric characteristics of volunteers at the beginning (Day 1) and at the end of the study (Day 30). Data are mean \pm SEM.

Parameter	Group 1 (consuming less oxidized oil + diet)		Group 2 (consuming more oxidized oil + diet)		Group 3 (consuming only diet)	
	Day 1	Day 30	Day 1	Day 30	Day 1	Day 30
Weight (kg)	70.17 \pm 3.71	69.38 \pm 3.61	68.77 \pm 3.42	67.78 \pm 3.41	75.15 \pm 3.95	74.29 \pm 3.94
Height (cm)	1.60 \pm 0.02	–	1.59 \pm 0.01	–	1.61 \pm 0.01	–
BMI (kg/m ²)	27.43 \pm 1.41	27.10 \pm 1.34	28.65 \pm 2.13	26.94 \pm 1.36	29.00 \pm 1.50	28.64 \pm 1.45
Hip/waste (cm)	86.5 \pm 2.1	–	87.2 \pm 3.0	–	86.0 \pm 2.9	–
Systolic pressure (mmHg)	129.9 \pm 0.50	118.2 \pm 0.42*	123.7 \pm 0.66	120.2 \pm 0.41	118.6 \pm 0.37	119.4 \pm 0.41
Diastolic pressure (mmHg)	77.2 \pm 0.26	68.9 \pm 0.21*	73.9 \pm 0.34	75.1 \pm 0.29	73.3 \pm 0.34	72.8 \pm 0.20

*Statistically significant difference with respect to Day 1, $p < 0.05$.

Table 4. Changes in circulating parameters of volunteers at the beginning (Day 1) and at the end (Day 30) of the study. Results are expressed as means \pm SEM.

Parameter	Group 1 (consuming less oxidized oil + diet)		Group 2 (consuming more oxidized oil + diet)		Group 3 (consuming only diet)	
	Day 1	Day 30	Day 1	Day 30	Day 1	Day 30
Glucose (mg/dL)	103.35 \pm 3.18	116.24 \pm 4.30*	108.96 \pm 11.11	111.37 \pm 2.46	99.72 \pm 4.53	108.26 \pm 2.55
Cholesterol (mg/dL)	246.64 \pm 12.92	217.76 \pm 8.98*	232.94 \pm 12.55	237.52 \pm 7.54	236.78 \pm 4.17	227.22 \pm 6.02
TGs (mg/dL)	164.41 \pm 15.43	125.52 \pm 12.34*	160.41 \pm 11.34	116.88 \pm 11.43*	174.83 \pm 19.83	130.04 \pm 10.18*
GPT (U/L)	22.70 \pm 2.71	20.69 \pm 3.34	24.90 \pm 2.96	18.46 \pm 1.62	23.54 \pm 3.92	19.94 \pm 2.19

*Statistically significant difference with respect to Day 1, $p < 0.05$.

Discussion

Trial limitations

The limitations that the study presents stem from the Reflotron[®] Plus (Roche, Barcelona, Spain) apparatus used for measurement, as the results that we obtained corresponded to the total cholesterol level, without expressly determining the parts corresponding to HDL and LDL.

External validity and applicability of the trial findings

The female participants in this study were chosen from one pharmacy in a southeastern Spanish city. Nevertheless, we can state that the results are applicable to women in urban environments, taking into account that lifestyles and eating habits are similar in most Spanish cities. On the other hand, other factors that could also influence the study variables have not been taken into account, as this study is centred exclusively on the consumption of ω -3 supplements, diet and their effects on certain parameters of the lipid profile used as primary variables and their effect on other external parameters (weight, height, BMI, hip/waist ratio, and systolic and diastolic pressures) used as secondary variables. With regards to the ω -3 capsules studied, the results would be valid under the aforementioned terms for the 16 brands analysed.

Discussion of results

The results of this study show that the oxidative state greatly differs among commercially available fish oil-based dietary supplements. According to our results, high levels of peroxides detected in some of these supplements may minimize the efficiency or benefits attributed.

Peroxide index levels observed in this study were similar to several previous reports on fish oil quality performed by other researchers (Higdon et al., 2000). However, the presence of oxidation by-products in commercialized capsules is mainly attributed to the quality of the starting raw material rather than to the storage conditions. The addition of antioxidants, mainly vitamin E, at the time of encapsulation may minimize lipid oxidation during storage. Nevertheless, the initial oxidation state may affect the oil flavour and subsequently consumer acceptance. According to a previous report (Huss, 1975), the organoleptic acceptability limit for peroxide index of crude fish oil is 7–8 meq/kg and the oils of all capsules analysed in this study widely overpassed this value (Table 2). However, this is not a limiting parameter in the moment of consumption, as the encapsulation of the oil hides the undesirable flavours that would cause consumer rejection. This allows that all lipid oxidation by-products present inside the capsule have free access to the gut, and can be easily absorbed and distributed through the bloodstream to all the body compartments.

This study assessed the effects of the consumption of dietary supplements containing known amounts of ω -3 PUFAs (EPA + DHA) on the reduction of certain circulating lipid profile markers. Even though the oxidation degree could not be directly determined in EPA and DHA, our results clearly show that the oxidation state of the oil impairs the potential benefits that these fatty acids may exert in the control of circulating lipid parameters.

We have observed beneficial effects in circulating lipid parameters (total cholesterol and/or TG) in all intervention groups. Similar effects were observed in an intervention study by administering 0.33 g/day of EPA + DHA to patients aged 45–65 years who presented moderate hyperlipemia (Carrero et al., 2004). Altogether, these observations suggested that the consumption of supplements, in conjunction with a balanced diet,

contributes to the stabilization of a circulating lipid profile, including TG and cholesterol.

In our study, a decrease in TG was observed in all three intervention groups, suggesting that diet, and likely the PUFAs present, are key factors in reducing circulating TG. Several studies support this idea (Nodari et al., 2011). These effects seem to be exerted by decreasing the biosynthesis of VLDL and TG in liver, with no alterations in the synthesis of HDL (Manerba et al., 2010). However, these effects can be reverted when ω -6 rich oils are ingested, indicating that the ratio ω -3/ ω -6 is instrumental in controlling circulating lipids (Roth & Harris, 2010). In addition, other studies indicate that despite the beneficial effect fish oil may have in lowering circulating TG, it can also increase the highly oxidizable plasmatic ω -3 PUFA fraction that could contribute to an oxidative stress situation in certain cell types. In this context, it must be indicated that not all unsaturated fatty acids are cytotoxic. EPA and DHA that present more double bonds than arachidonic acid are less cytotoxic than this fatty acid. This difference seems to reside in the way how EPA and DHA are metabolized by different cell types, leading to cytoprotective effects by increasing eicosanoid catabolism and decreasing cyclooxygenase-2 activity (Di Nuncio et al., 2011).

In addition to the nature of fatty acids, the amounts consumed are important as well. The daily intake of >3 g of ω -3 fatty acids results in a 30% reduction in circulating TG (Skulas-Ray et al., 2008). However, the mentioned amounts of ω -3 fatty acids cannot be reached by consuming only a balanced diet, making thereby necessary the intake of supplements in the form of capsules (Kris-Etherton et al., 2002). Supplementation could also help not only in plasma TG lowering, but also in cholesterol reduction as observed in our study. In addition, this effect in plasmatic cholesterol lowering is reverted when the supplements administered present a high degree of oxidation (this study). Furthermore, it is not clear that dietary PUFAs from fish may alone exert this protective effect by reducing circulating TG. In this context, it cannot be discarded the existence of synergistic effects with other diet components, including oleic acid and natural antioxidants, which are also present in the diet provided in this study. Finally, the form of cooking is another key factor. It has been observed that the cardiobeneficial effects of PUFAs occur when fish is consumed roasted but not fried (Geleijnse et al., 2010).

Another interesting finding in our study was the lowering of the blood pressure in the group consuming less oxidized oil. There is scientific evidence that the ω -3 PUFAs can stimulate endothelial production of NO (Harris et al., 2003). This molecule causes relaxation of smooth muscle allowing the dilation of blood vessels, which in turn reduces blood pressure and endothelial activation (Appel et al., 1993; Brown & Hu, 2001). In this context, a meta-analysis of 36 studies indicated that the intake of ω -3 fatty acids in the form of pills positively correlates with a reduction of 2.1 mmHg in the systolic pressure and of 1.6 mmHg in the diastolic pressure (Geleijnse et al., 2002). On the other hand, the adherence to the Mediterranean diet is related to a decrease in the diastolic blood pressure (Reddy & Katan, 2004). Several studies found a reduction of 3 and 2 mmHg in systolic and diastolic pressures, respectively, in 180 individuals consuming a Mediterranean diet versus a control diet after a 2-year follow-up (Alonso, 2004; Esposito et al., 2004). The origin of these effects seems to be associated to the intakes not only of fish, but of vegetables and olive oil as well (Din et al., 2004; Esposito et al., 2004). A similar conclusion has been obtained from other cohort studies (Masala et al., 2008). Altogether, it seems that the presence of fish in the Mediterranean diet model can add synergistic beneficial effects in endothelial function (Harris et al., 2003) in addition to those provided by olive oil, vegetable and even moderate red wine consumption (Karatzis et al., 2008).

Conclusions

Therefore, we conclude that the level of oxidation of ω -3 supplements has to be considered as a key factor that may affect the circulating lipidic profile of consumers, producing an opposite effect than as claimed by the product. In this context, manufacturers must pay special attention to the quality of the prime product prior to commercialization.

Acknowledgements

Authors want to thank M^a Asunción Iborra Campos for their help in sample collection in her Pharmacy.

Consort Checklist: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/clinical-trials/anuncios>

Trial Protocol: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/clinicaltrials/anuncios>

Trial registration: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01799720

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

E. R. is recipient of grant Instituto de Salud Carlos III-FEDER (PS09/01093). V. M. and E. R. are recipients of a grant PROMETEO/2012/007 from Generalitat Valenciana and are members of the "Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición" CIBERobn (CB12/03/30038). Capsules from different brands were acquired by Nursing Department from University of Alicante, Alicante, Spain.

References

- Alonso A, de la Fuente C, Martín-Arnau AM, de Irala J, Martínez JA, Martínez-González MA. 2004. Fruit and vegetable consumption is inversely associated with blood pressure in a Mediterranean population with a high vegetable-fat intake: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Study. *Br J Nutr* 92:311–319.
- Appel LJ, Miller 3rd ER, Seidler AJ, Whelton PK. 1993. Does supplementation of diet with "fish oil" reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch Intern Med* 153: 1429–1438.
- Brown AA, Hu FB. 2001. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 73:673–686.
- Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, Young S, et al. 2012. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am J Clin Nutr* 96:748–758.
- Carrero JJ, Baro L, Fonolla J, Gonzalez-Santiago M, Martínez-Ferez A, Castillo R, Jimenez J, et al. 2004. Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia. *Nutrition* 20:521–527.
- Di Nuncio M, Valli V, Bordini A. 2011. Pro- and anti-oxidant effects of polyunsaturated fatty acid supplementation in HepG2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85:121–127.
- Din JN, Newby DE, Flapan AD. 2004. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease—fishing for a natural treatment. *BMJ* 328:30–35.
- EFSA. 2005. Opinion of the Scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fats, polyunsaturated fats and unsaturated fats, Request No. EFSA-Q-2004-107, adopted on 6 July 2005. Available at: http://www.efsa.eu.int/science/nda/nda_opinions/catindex_en.html.
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, et al. 2004. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 292:1440–1446.
- Geleijnse JM, de Goede J, Brouwer IA. 2010. Alpha-linolenic acid: is it essential to cardiovascular health? *Curr Atheroscler Rep* 12:359–367.
- Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR, Kok FJ. 2002. Blood pressure response to fish oil supplementation: meta-regression analysis of randomized trials. *J Hypertens* 20:1493–1499.
- Guidelines Committee. 2003. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21:1011–1053.
- Harris WS. 1996. N-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids* 31:243–252.
- Harris WS, Park Y, Isley WL. 2003. Cardiovascular disease and long-chain omega-3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 14:9–14.
- Hayashi N, Tashiro T, Yamamori H, Takagi K, Morishima Y, Otsubo Y, Sugiura T, et al. 1998. Effects of intravenous omega-3 and omega-6 fat emulsion on cytokine production and delayed type hypersensitivity in burned rats receiving total parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 22:363–367.
- Higdon JV, Lin J, Du SH, Morrow JD, Ammes BN, Wander RC. 2000. Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F(2)-isoprostanes. *Am J Clin Nutr* 72:714–722.
- Hirai A, Terano T, Tamura Y, Yoshida S. 1989. Eicosapentaenoic acid and adult diseases in Japan: epidemiological and clinical aspects. *J Intern Med* 255:69–75.
- Huss HH. 1975. Principal changes during storage wet fish FAO/DANIDA training course on quality aspects in the handling and storage of fish 4, Copenhagen (Denmark), Rome (Italy): FAO, 15p.
- Karatzis K, Papamichael C, Karatzis E, Papaioannou TG, Voidonikola PT, Vamvakou GD, Lekakis J, Zampelas A. 2008. Postprandial improvement of endothelial function by red wine and olive oil antioxidants: a synergistic effect of components of the Mediterranean diet. *J Am Coll Nutr* 27:448–453.
- Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of *Alaska pollack* skin. *J Agric Food Chem* 49: 1984–1989.
- Kolanowski W, Jaworska D, Weißbrodt J. 2007. Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich foods. *J Sci Food Agric* 87:181–191.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106: 2747–2757.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ; American Heart Association. 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:151–152.
- Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C. 1985. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 312:1205–1209.
- Manerba A, Vizzardi E, Metra M, Dei Cas L. 2010. N-3 PUFAs and cardiovascular disease prevention. *Future Cardiol* 6:343–350.
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424:83–95.
- Masala G, Bendinelli B, Versari D, Saieva C, Ceroti M, Santagiuliana F, Caimi S, et al. 2008. Anthropometric and dietary determinants of blood pressure in over 7000 Mediterranean women: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Florence cohort. *J Hypertens* 26:2112–2120.
- Mickleborough TD, Murray RL, Ionescu AA, Lindley MR. 2003. Fish oil supplementation reduces severity of exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1181–1189.
- Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gotsche PC, Devereaux PJ, Elbourne D, et al., for the CONSORT Group. 2010. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trial. *BMJ* 340:c869.
- NCEP. 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106:3143–3421.
- Nodari S, Triggiani M, Campia U, Manerba A, Milesi G, Cesana BM, Gheorghide M, Dei Cas L. 2011. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 57: 870–879.
- Ooi EM, Lichtenstein AH, Millar JS, Diffenderfer MR, Lamón-Fava S, Rasmussen H, Welty FK, et al. 2012. Effects of therapeutic lifestyle change diets high and low in dietary fish-derived FAs on lipoprotein

- metabolism in middle-aged and elderly subjects. *J Lipid Res* 53: 1958–1967.
- Ottestad I, Hassani S, Borge GI, Kholer A, Vogt G, Hyötyläinen T, Orešič M, et al. 2012. Fish oil supplementation alters the plasma lipidomic profile and increases long-chain PUFAs of phospholipids and triglycerides in healthy subjects. *PLoS One* 7:e42550.
- Peters BS, Wierzbicki AS, Moyle G, Nair D, Brockmeyer N. 2012. The effect of a 12-week course of omega-3 polyunsaturated fatty acids on lipid parameters in hypertriglyceridemic adult HIV-infected patients undergoing HAART: a randomized, placebo controlled pilot trial. *Clin Ther* 34:67–76.
- Reddy SK, Katan MB. 2004. Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. *Public Health Nutr* 7: 167–186.
- Ricque-Marie D, Abdo-de La Parra MI, Cruz-Suarez LE, Cuzon G, Cousin M, Pike IH. 1998. Raw material freshness, a quality criterion for fish meal fed to shrimp. *Aquaculture* 165:95–109.
- Roth EM, Harris WS. 2010. Fish oil for primary and secondary prevention of coronary heart disease. *Curr Atheroscler Rep* 12: 66–72.
- Schulz KF, Altman DG, Moher D, for the CONSORT Group. 2010. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Trials* 11:32–39.
- Skulas-Ray AC, West SG, Davidson MH, Kris-Etherton PM. 2008. Omega-3 fatty acid concentrates in the treatment of moderate hypertriglyceridemia. *Expert Opin Pharmacother* 9:1237–1248.
- Song JH, Kenshiro F, Miyazawa T. 2000. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J Nutr* 130: 3028–3033.
- Zhang J, Wang C, Li L, Man Q, Meng L, Song P, Frøyland L, Du ZY. 2012. Dietary inclusion of salmon, herring and pompano as oily fish reduces CVD risk markers in dyslipidaemic middle-aged and elderly Chinese women. *Br J Nutr* 108:1455–1465.



Manuscript Number:

Title: COMPARISON OF SOXHLET AND ULTRASOUND METHODS FOR OIL EXTRACTION
FROM SPANISH FLAXSEEDS

Article Type: Research paper

Keywords: *Linum usitatissimum*; oil yield; process optimization; seed oil
extraction; Soxhlet; ultrasounds

Corresponding Author: Dr. Enrique Roche, PhD

Corresponding Author's Institution: University Miguel Hernandez

First Author: Vanessa Garcia-Hernandez

Order of Authors: Vanessa Garcia-Hernandez; Mohamed Hojjati, PhD; Angel
Carbonell-Barrachina, PhD; Joaquin Sanchez-Soriano, PhD; Enrique Roche,
PhD; Elena Garcia-Garcia, PhD

Abstract: Flaxseed oil contains an outstanding amount of the essential fatty acid α -linolenic acid (18:3n-3), as well as other ω -3 fatty acids, which can provide potential benefits in individuals with cardiovascular diseases. This explains the interest of food industries to improve the efficiency of oil extraction from flaxseed. In this sense, the feasibility of two extraction methods (Soxhlet and ultrasounds) has been evaluated through the determination of the amount of oil obtained from 9 flaxseed trademarks (*Linum usitatissimum* L.). In general, the Soxhlet method extracted more oil than the ultrasounds, with mean values being 36.9 and 20.0%, respectively. Aside from the extraction method, flaxseed trademark was also an influencing variable. In this context, the highest extraction yield (53%) was detected when the Soxhlet method in combination with petroleum ether were used with trademark 1 (raw golden flaxseed). These conclusions were only based on the extraction yield. However, further studies are needed to evaluate the quality and safety of the extracted oils.



17th January, 2017

Dear Managing Editor:

Here we send you the manuscript entitled **COMPARISON OF SOXHLET AND ULTRASOUND METHODS FOR OIL EXTRACTION FROM SPANISH FLAXSEEDS** which we would like to be considered for publication in "Journal of Food Composition and Analysis"

By: García-Hernández VM, Hojjati M, Carbonell-Barrachina AA, Sánchez-Soriano J, Roche E, García-García E

All authors have read and approved this version of the manuscript and are prepared to take public responsibility for its contents. No conflicts of interest exist.

This manuscript has been submitted previously to this journal, but the final PDF built has not been approved because a mistake in the e-mail address of the corresponding author (egracia@umh.es instead egarcia@umh.es). I tried to login into my account but it was blocked. We have written the editorial assistance service several days ago (January 11th) and we have no answer yet. For this reason, we have decided to send the manuscript again.

Were there any questions regarding our submittal, please do not hesitate to contact me at the address shown below. We look forward to your comments and decision on our contribution in due time.

Sincerely,

Elena García García
(egarcia@umh.es)
On behalf of co-authors

Department of Applied Biology-Nutrition and Institute of Bioengineering. Miguel Hernandez University, Elche (Alicante), Spain

egarcia@umh.es

Institute of Bioengineering. Edificio Vinalopó – 03202 Elche, Alicante (SPAIN)
Telf.: 34 96 5222005

**COMPARISON OF SOXHLET AND ULTRASOUND METHODS FOR OIL
EXTRACTION FROM SPANISH FLAXSEEDS**

**García-Hernández VM¹, Hojjati M², Carbonell-Barrachina AA³, Sánchez-Soriano J⁴,
Roche E^{1,5,6}, García-García E¹**

- (1) **Biochemistry and cell Therapy Unit, Institute of Bioengineering. University Miguel Hernández, Elche, Alicante (Spain).**
- (2) **Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources. University of Khouzestan, Mollasani, Ahvaz (Iran).**
- (3) **Group of Food Quality and Safety, Agro-Food Technology Department, University Miguel Hernández, Orihuela, Alicante (Spain).**
- (4) **U.I. Center of Operations Research (CIO). Miguel Hernández University, Elche, Alicante (Spain).**
- (5) **CIBERObn (Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición CB12/03/30038) Instituto de Salud Carlos III, Spain.**
- (6) **Department of Applied Biology-Nutrition, University Miguel Hernandez, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL-FISABIO Foundation), Alicante, Spain.**

Running title: *Optimization of oil extraction in flaxseeds*

Corresponding author:

Elena García-García

Institute of Bioengineering. Miguel Hernández University. Avda. de la Universidad s/n.

03202-Elche (Alicante) Spain.

Phone: +34965222005. Fax: +34965222033.

e-mail: egarcia@umh.es

ABSTRACT

Flaxseed oil contains an outstanding amount of the essential fatty acid α -linolenic acid (18:3n-3), as well as other ω -3 fatty acids, which can provide potential benefits in individuals with cardiovascular diseases. This explains the interest of food industries to improve the efficiency of oil extraction from flaxseed. In this sense, the feasibility of two extraction methods (Soxhlet and ultrasounds) has been evaluated through the determination of the amount of oil obtained from 9 flaxseed trademarks (*Linum usitatissimum* L.). In general, the Soxhlet method extracted more oil than the ultrasounds, with mean values being 36.9 and 20.0%, respectively. Aside from the extraction method, flaxseed trademark was also an influencing variable. In this context, the highest extraction yield (53%) was detected when the Soxhlet method in combination with petroleum ether were used with trademark 1 (raw golden flaxseed). These conclusions were only based on the extraction yield. However, further studies are needed to evaluate the quality and safety of the extracted oils.

Keywords: *Linum usitatissimum*; oil yield; process optimization; seed oil extraction; Soxhlet; ultrasounds.

Chemical compounds studied in this article

Diethylether (Pubchem CID:3283); *n*-Hexane (Pubchem CID: 8058); Petroleum ether-Piperonyl butoxide (Pubchem CID: 5794).

1. INTRODUCTION

Essential unsaturated fatty acids are abundantly present in fish oils, which unfortunately are a limited source from an environmental point of view. Despite this, the relationship of ω -3 consumption with the prevention of cardiovascular disease (Zhang et al., 2012) has increased the interest of food and pharmaceutical industries to explore new and more sustainable sources in order to obtain unsaturated fatty acids. A potentially interesting option is flaxseed oil. In this vein, the high amount of the essential fatty acid α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) and other ω -3 fatty acids in flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.) is a unique feature among edible plant sources (Ganorkar & Jain, 2013; Singh et al., 2011). This implies the need for protocols that allow highly performing, efficient, and economical extraction methods. On this basis, it is important to define the best processes that allow manufacturing of flaxseed oils into rich, high quality and functional components.

In this context, the multiple beneficial properties on health, both preventive and curative, especially if the product is included in the daily diet, have increased the interest of the consumers for flaxseeds and their based-products, mainly oil (Pan et al., 2009; Tongson et al., 2004). Flaxseed oil has significant nutritional benefits, mainly due to the abundance of ω -3 fatty acids, has a considerable content of lignans and contains polyphenolic compounds, which are mostly responsible for its high antioxidant capacity (Best, 2004; Turatti, 2000). The consumption of these components is associated with beneficial effects on hormonal regulation, as well as in the prevention of diseases, such as cancer, diabetes and cardiovascular problems (Morris, 2001). Altogether, this explains why worldwide researchers are looking for plant oil extraction methods that are efficient, economic and environment-friendly.

Since the extraction method has a significant impact on the quality of the commercial oil and its functionality, we have decided to explore this aspect in the present study by using different

flaxseed trademarks. The decision to carry out trials with different flaxseed brands was to analyze if there are differences among them when using the same oil extraction method, i.e., if the efficiency of the oil extraction may differ among the trademarks analyzed or, for a particular sample, obtaining higher performance is associated with a given method of extraction. This is due to the fact that each sample has particular biological and physical-chemical characteristics, which could produce a better or worse response to certain solvents or methods. To our knowledge, there are no comprehensive studies on the effect of different protocols on flaxseed oil extraction. Therefore, it is necessary to evaluate the effect of various parameters influencing the extraction of oils from commercial brands of flaxseed, including solvent, extraction time, temperature, and the amount of sample and the volume of solvent used.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Nine samples of gold and brown flaxseeds obtained from drugstores, food and nutrition stores and large farms were used. Flaxseed samples arrived to the laboratory in plastic bags identified with a bar code, in 250 or 500 g formats. Once registered, flaxseed samples were grinded in a domestic Taurus grinder, model Aromatic, 230V-50 Hz, 150W Barcelona (Spain), including samples 7-9. Afterwards, the samples were taken to the CSA (Food Quality and Safety) Research Group facilities for analysis. This preparation of the samples was essential to allow the solvent to penetrate into the seed cells and achieve a complete removal/extraction of the oil.

Twenty grams of flaxseeds were used to perform the oil extraction by the Soxhlet method, while 1 g of flaxseeds was used for the ultrasound method. These quantities were used to ensure that sufficient amount of oil could be extracted. The sample was placed in a paper filter bag. The evaluation of the performance of the oil extraction from flaxseeds was performed

based on the total dry mass of the sample under analysis and the extracted oil content. Thus, the performance was determined by the ratio of the mass of oil obtained and the total mass of the sample. Results were expressed as a weight percentage, using equation 1: $\text{Fat (\%)} = (W' - W / W'') \times 100$, where, W = weight (g) of the filter bag; W' = weight (g) of the filter bag with fat; W'' = weight (g) of the sample.

2.2. Oil extraction

The samples of 9 commercial brands of ground flaxseeds were used for oil extraction (Table 1). The total supply of digestible rumen undergraded protein (RUP) was not significantly different between seed types (Khan et al., 2014). Extraction was carried out using 2 methods (Soxhlet and ultrasounds), and with three different types of solvents (petroleum ether, diethyl ether and *n*-hexane). The oil obtained from extraction was stored in amber jars and frozen until analysis. After the extraction, the oil presented a pale yellow color.

2.3. Soxhlet extraction method

The Soxhlet method involves a solid-liquid extraction, and its main advantage is that the sample is continuously in contact with the solvent, which helps to shift the balance of the transfer towards the solvent. It is also a simple method that allows extracting greater amounts of sample than most modern methods. Some disadvantages of the Soxhlet extraction compared to other techniques include the time required for the extraction and the use of solvent. In addition, samples are taken to the boiling point of the solvent for a long period of time, increasing the possibility of thermal decomposition of certain components of the oil. The Soxhlet apparatus used in this experiment, J.P. Selecta, model 60003286, (Selecta, Barcelona, Spain) does not allow for stirring, which would accelerate the extraction process. Due to the large amount of solvent used, evaporation or concentration after the extraction with the rotary evaporator R-205 was required (Buchi, Flawil, Switzerland) under reduced pressure (100 mbar) and at a temperature of 40 °C (Figure 1).

2.4. Extraction of oil by ultrasounds

The application of ultrasounds (sound waves of high frequency, 20-40 kHz) facilitates the release of oil from the cell walls of plant material subjected to the extraction process. Ultrasounds are formed of high frequency energy waves undetectable by the human ear. The resulting vibrations provoke the expansion and compression of the material. This oscillating motion forms bubbles or cavities in the liquid where, by effect of the waves, the temperature is increased causing the breakdown of the surface tension. This favors the solubility by penetrating the solvent into the plant material and dragging with it the active components due to concentration differences (Azuola & Vargas, 2007). Therefore, this extraction technique is based on the mass transfer of solid components into the solvent that is subjected to ultrasound, using as a phenomenon of transport the diffusion through the cell wall and convection in the pores of the solid component. The effect of the ultrasounds resulted in solid and liquid particles in constant vibration and acceleration, causing the rapid passage of the solute located in the solid phase to the solvent (Azuola & Vargas, 2007). Approximately 1 g of flaxseeds samples were used for the application of the ultrasonic waves, using different solvents. The samples were exposed continuously to sound waves in a bath, in cycles of 3 h at 40 kHz of frequency (Hojatti, 2008) (Figure 1).

2.5. Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using STATGRAPHICS Centurion XV software (StatPoint Technologies, Inc. Warrington, VA, USA). Significance was defined at $p \leq 0.05$. Data were reported as mean, standard deviation and the minimum and maximum values. Inter-group statistical comparisons were performed using the analysis of variance with three factors (method, solvent and trademark). The one-way analysis of variance, the Levene's test for the study of homogeneity among variances, as well as the Kruskal-Wallis hypothesis tests followed by Fisher's least significant difference (LSD) were used in order to determine which

means were significantly different from the others. A rank transformation of the data was performed, although the obtained results were essentially the same. A box-and-whisker plot was used to graphically represent the data.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The oil extraction from flaxseed samples is basically a mass transfer procedure, and depends on key parameters such as the choice of the most adequate extraction method, the type of solvent used, as well as the nature of the sample to be extracted. The selection of solvents used is mainly due to their polarity and their affinity for lipid components. One of the disadvantages of the use of solvents in these extraction methods is that there are legal restrictions on the maximum residues that may be left in the oils, especially when the oils are the raw material for the production of foods or nutraceutical products. These limits are based on current legislation and may vary in the future, but always towards lower contents to guarantee the safety of consumers. Furthermore, it is believed that prolonged exposure of the flaxseed samples to the solvents can cause oxidation of fatty acids (Singh et al., 2011).

Tables 2-7 show the results of the oil percentage obtained from samples of different flaxseed brands/trademarks. Each table summarizes the results obtained for each trial and its replicate, indicating the method applied and the flaxseed sample used. Also, the charts provide relevant statistical parameters such as the average value, standard deviation, as well as the upper and lower values obtained in each test.

The extraction efficiency depends on several factors, including the extraction method used (including the solvent) and the oil content in the seeds. Regarding the extraction method, data on Tables 2-4 show that high percentages of oil were obtained by the Soxhlet method when using the 3 assayed solvents (36.6% petroleum ether, 39.6% diethyl ether and 34.2% *n*-hexane). Data on Tables 5-7 indicate that lower percentages of oil were extracted by the

ultrasounds method using the 3 assayed solvents (21.6% petroleum ether, 19.3% diethyl ether and 19.0% *n*-hexane), as compared to those above shown for the Soxhlet method.

The data in tables 2 and 5 indicate that the extraction method leading to the highest mean oil content, when using petroleum ether as solvent, was Soxhlet (36.6%) as compared to ultrasounds (21.6%). This result was also observed in tables 3 and 6, where diethyl ether was used as solvent (39.6% with Soxhlet, 19.3% with ultrasounds); as well as in tables 4 and 7, where *n*-hexane was used (34.2% with Soxhlet, 19.0% with ultrasounds). Therefore, with respect to the methodology used for extraction, the results support that Soxhlet was the higher performing method. This is partly due to the steam being not directly in contact with the solvent in the liquid state and therefore less amount of the oil was degraded when the temperature was increased (AOAC, 1998). In this context, the considerable oil yield obtained with Soxhlet is a result of the mass transfer between samples and solvents at high temperature due to increased vapor pressure, which decreases viscosity.

Regarding the solvent used, diethyl ether yielded the best results in the Soxhlet extraction method, confirming previous reports indicating that this solvent is more efficient in extracting acyclic hydrocarbons (Tornabene et al., 1982). On the other hand, the best results for the ultrasound extraction method were obtained when petroleum ether was the selected solvent. These are positive results because the two solvents have low toxicity for both humans and the environment and it is relatively simple to treat and dispose of (Metherel et al., 2009). In any case, the solvents used in this study are recognized as having a low risk for human health (European Medicines Agency, 2009).

Regarding the brand, sample 9 (milled golden flaxseed) presented the highest performance values when using the Soxhlet method, reaching up to 49.0% (Tables 3 and 4). In this context, the oil content in the flaxseeds depended on the variety and climate conditions of the location where they were cultivated (Gallegos, 2008; InfoAgro, 2014). The difficulty that can arise in

the oil extraction is that flaxseeds oil is strongly trapped in the intracellular oil-containing granules. Additionally, seeds have a woody structure. For this reason, the material must be previously grinded in order to allow a greater contact area between the solid material and the solvent. The small particles resulting from the grinding facilitate the solvent extraction, by decreasing the distances that the oil and solvent must travel, inside and outside the seeds (Best, 2004; Morris, 2001; Turatti, 2000). This explains why trademark 9 gave the higher extraction yield, because milling allowed smaller particle sizes.

Several studies have shown that the oil composition may vary depending on the extraction method used (Thongson et al., 2004). Therefore, it is important to identify all the parameters participating during the extraction. These will affect the oil properties and composition as well as their effects after consumption. For this reason, not only are performance and trademark important factors; other parameters must be considered, such as the extraction time, and the temperature of the process. The established time, which is different for the Soxhlet and ultrasounds methods, are 360 and 180 min, respectively. Regarding the extraction temperature, the Soxhlet method is performed at 40°C, while the ultrasound extraction is generally performed at room temperature (22-24°C).

A summary of the oil yields obtained during extraction with the different solvents is shown in Figure 2. The percentages of flaxseed oil extracted ranged from 6.1% (using ultrasounds with diethyl ether as solvent in trademark 8) to 53.0% (using the Soxhlet method with petroleum ether as solvent in trademark 1). It can also be observed that the method, independently of the solvent used, is the most influential factor regarding the extraction efficiency. Therefore, the Soxhlet method provided higher yields than the ultrasounds method for all three solvents. In particular, the mean oil percentage extracted by the Soxhlet method, 36.9%, was almost twice (1.8X) that obtained by the ultrasound method, 20.0%. The ranges of the Soxhlet method were between the highest value (yield= 53%) obtained with trademark 1 using petroleum

ether, and the lowest value (yield= 11.35%) with trademark 8 using the same solvent (Table 2).

The mean oil content detected in this study using Soxhlet, 36.9%, can be considered as adequate, but is certainly much lower than that previously reported by Backer (1978), who obtained results between 80% using mechanical extraction and 80-90% using solvent extraction with a temperature of 121°C, far from the temperature conditions used in the present study. On the other hand, the percentage of extracted oil using different solvents in the current study were found to be higher than those reported by other authors (Ahsan et al., 2015; Mata, 2009)

Table 9 summarizes the ANOVA results for the 3 factors under analysis (extraction method, solvent and trademark). This analysis shows that the method and trademark have a statistically significant effect on the percentage of flaxseed oil extracted ($p < 0.001$), while the choice of solvent does not significantly affect the values (see Table 8). Likewise, the most contributing factor, which explained 49.3% of the total variation of the percentage of oil extracted was the method used, followed by the trademark (29.8%). Again, solvent type did not contribute to variations in the percentages of oil extracted.

The one-way analysis of variance (Table 10) and Kruskal-Wallis test for the factor trademark showed that there were statistically significant differences (both in means and medians) among the trademarks when extracting flaxseed oil ($p < 0.001$ in both cases). As previously mentioned, the mean percentage of flaxseed oil extracted using the Soxhlet method was 36.9%, whereas using the ultrasound method the value obtained was 20.0%. After analyzing the multiple range tests (both for the original data and the transformed data using the rank function) and applying the 95% LSD procedure, it was observed that the 9 trademarks could be ranked in increasing order of the mean percentage of flaxseed oil extracted in the following

manner: {8}<{2}<={4,1,3,7}<={5,6}<={9}. Therefore, the trademark is a matter of consideration when analyzing the amount of oil content in a flaxseed.

Finally, other parameters that have not been considered in this study should also be taken into account, such as the quality of the oil obtained, the behavior of the solvent used for extraction, and the final use of the oil. Quality of the final oil can be assessed by determining the fatty acid composition and oxidation levels. Regarding solvent behavior and final use, the solvent type, toxicity and means used for disposal are instrumental factors to consider.

4. CONCLUSIONS

Several conclusions can be extracted from this study. First, it has been demonstrated that the most influencing factors in the percentage of flaxseed oil extracted were the method and the trademark, while the solvent was not relevant (see Table 9). Second, it has been shown that the Soxhlet method was more efficient (on average) in flaxseed oil extraction than ultrasound, in particular, the mean percentage of flaxseed oil extracted by the method Soxhlet method was 36.9%, while that of the ultrasounds method was 20.0% (see Table 8). Third, the Soxhlet method provided better results using diethyl ether as the solvent, while the ultrasound method provided better performance using petroleum ether as solvent (see Figure 2). Fourth, the percentages of flaxseed oil extracted ranged from 6.1% (using ultrasounds and diethyl ether as solvent in trademark 8) to 53.0% (using Soxhlet method and petroleum ether as solvent in trademark 1), which is a wide range, so further studies are necessary to better fit the results.

Regarding the optimization of the oil extraction from flaxseed products, the conclusion of this study was that the following conditions are recommended, when only considering extraction efficiency: (i) Soxhlet during an extraction time of 360 min, and (ii) using diethyl ether as solvent. The ultrasound method led to smaller amounts of extracted oil. However, this method has several advantages, including the use of shorter extraction times and lower temperatures,

thereby minimizing the risk associated to this process. Finally, further research regarding the quality of the oil extracted is currently being performed in our laboratory.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

ER is a member of the CIBERobn (Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición CB12/03/30038), Instituto de Salud Carlos III (Spain). ER is recipient of a grant (PROMETEO/2016/006) from Generalitat Valenciana (Spain).

6. REFERENCES

- Ahsan, H., Ahad, A., Siddiqui, W. A. (2015). A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. *Journal of Chemical Bioogy*, 84 (2), 45-59.
- AOAC (1998). *Official Methods of Analysis*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemistry.
- Azuola, R., Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonidos (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20, 4.
- Backer, K. W. (1978). Solvent extraction of soybeans. *Journal American Oil Chemistry Society*, 55, 754-761.
- Best, D. (2004). Low-Carb revolution fuels innovation with flaxseed. Retrieved January 10, 2017 from: <http://www.functionalingredientmag.com>
- European Medicines Agency (2009). Committee for medicinal products for human use (CHMP). Reflection paper on the regulatory guidance for the use of health-related quality of life (HRQL) measures in the evaluation of medicinal products. Retrieved January 10, 2017 from: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
- Gallegos, W. (2008). Manual de Parámetros Técnicos para el cultivo del lino (*Linum usitatissimum*). Escuela de Ciencia Agrícolas y Ambientales (ECAA), Ecuador: http://pucesi.edu.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=194&Itemid=730

- Ganorkar, P. M., Jain, R. K. (2013). Flaxseed, a nutritional punch. *International Food Research Journal*, 20, 519-525.
- Hojjati, M. (2008). Oil characteristics and fatty acid content of seeds from three date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Khuzestan. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 5 (1), 69-74.
- InfoAgro (2014). Cultivo de lino. Retrieved January 10, 2017 from: www.infoagro.com.
- Khan, N. A., Booker, H., Yu, P. (2014). Molecular structures and metabolic characteristics of protein in brown and yellow flaxseed with altered nutrients traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (28), 6556-6564.
- Mata, T. M. (2009). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy*, 14, 217-234.
- Metherel, A. II., Taha, A. Y., Izadi, II., Stark, K. D. (2009). The application of ultra sound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81 (5-6), 417-423.
- Morris D. H. (2001). Essential nutrients and other functional compounds in flaxseed. *Nutrition Today*, 36(3), 159-162.
- Pan, A., Yu, D., Demark-Wahnefried, W., Franco, O. H., Lin, X. (2009). Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 288-297.
- Singh, K. K., Mridula, D., Rehal, J., Barnwal P. (2011). Flaxseed: A potential source of food, feed and fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 210-222.
- Thongson, C., Davidson P. M., Mahakarnchanakul, W., Weiss, J. (2004). Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent extracted spices. *Applied Microbiology*, 39 (5), 401-406.

- Tornabene, T., Amotz B. A., Hubbart, J. (1982). Isolation, analysis and identification of lipids. *Phycology*, 21, 71-78
- Turatti, J. M. (2000). Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. *Óleos & Grãos*, 56,20-27.
- Zhang, J., Wang, C., Li, L., Man, Q., Meng, L., Song, P., Frøyland, L., Du, Z. Y. (2012). Dietary inclusion of salmon, herring and pompano as oil fish reduces CVD risk markers in dyslipidaemic middle-aged and elderly Chinese women. *British Journal of Nutrition*, 108, 1455-1465.



Table 1. Main characteristics of the samples used in the study.

Trademarks	Golden	Brown	Presentation
1	✓		Raw seeds
2	✓		Raw seeds
3	✓		Raw seeds
4	✓		Raw seeds
5	✓		Raw seeds
6	✓	✓	Raw seeds
7	✓	✓	Grinded
8	✓	✓	Milled
9	✓		Milled



Table 2. Oil yield (%) obtained after extraction by the Soxhlet method using petroleum ether.

SOXHLET EXTRACTION METHOD			
Solvent: petroleum ether			
Trademarks (20 g)	Oil (%)	Replicates	Oil (%)
1	36.50	1	53.00
2	31.20	2	30.60
3	41.45	3	38.70
4	46.00	4	37.45
5	40.90	5	36.00
6	40.00	6	38.85
7	35.40	7	36.55
8	11.35	8	11.80
9	48.05	9	45.05
Mean	36.76		36.44
SD	10.85		11.19
Upper range	48.05		53.00
Lower range	11.35		11.80

Table 3. Oil yield (%) obtained after extraction by the Soxhlet method using diethyl ether.

SOXHLET EXTRACTION METHOD			
Solvent: diethyl ether			
Trademark (20 g)	Oil (%)	Replicates	Oil (%)
1	38.50	1	41.50
2	42.25	2	33.75
3	44.10	3	43.75
4	41.45	4	44.65
5	41.20	5	43.05
6	45.75	6	45.55
7	42.80	7	40.15
8	15.80	8	15.45
9	44.00	9	49.00
Mean	39.54		39.65
SD	9.14		10.00
Upper range	45.75		49.00
Lower range	15.80		15.45

Table 4. Oil yield (%) obtained after extraction by the Soxhlet method using *n*-hexane.

SOXHLET EXTRACTION METHOD			
Solvent: <i>n</i>-hexane			
Trademarks (20 g)	Oil (%)	Replicas	Oil (%)
1	25.70	1-1	35.75
2	29.00	2-1	30.55
3	37.75	3-1	38.10
4	24.50	4-1	15.70
5	40.35	5-1	45.30
6	50.60	6-1	42.35
7	36.80	7-1	41.90
8	14.75	8-1	14.10
9	50.20	9-1	49.60
Mean	34.41		33.98
SD	12.01		12.55
Upper range	50.60		49.60
Lower range	14.75		14.10

Table 5. Oil yield (%) obtained after extraction by the ultrasounds method using petroleum ether.

ULTRASOUNDS EXTRACTION METHOD			
Solvent: petroleum ether			
Trademarks (20 g)	Oil (%)	Replica	Oil (%)
1	16.90	1-1	26.60
2	17.70	2-1	32.20
3	19.60	3-1	23.80
4	23.40	4-1	30.60
5	20.30	5-1	27.80
6	20.60	6-1	27.50
7	19.90	7-1	22.30
8	7.70	8-1	10.40
9	16.90	9-1	24.70
Mean	18.11		25.10
SD	4.41		6.34
Upper range	23.40		32.20
Lower range	7.70		10.40

Table 6. Oil yield (%) obtained after extraction by the ultrasounds method using diethyl ether.

ULTRASOUNDS EXTRACTION METHOD			
Solvent: diethyl ether			
Trademarks (20 g)	Oil (%)	Replica	Oil (%)
1	21.30	1-1	18.30
2	20.40	2-1	14.80
3	15.40	3-1	18.10
4	24.20	4-1	21.40
5	24.10	5-1	20.60
6	21.80	6-1	19.50
7	25.70	7-1	18.80
8	7.80	8-1	6.10
9	26.50	9-1	23.30
Mean	20.80		17.88
SD	5.90		5.01
Upper range	26.50		23.30
Lower range	7.80		6.10

Table 7. Oil yield (%) obtained after extraction by the ultrasounds method using *n*-hexane.

ULTRASOUNDS EXTRACTION METHOD			
Solvent: <i>n</i>-hexane			
Trademarks (20 g)	Oil (%)	Replicas	Oil (%)
1	23.20	1-1	16.70
2	25.20	2-1	14.10
3	24.70	3-1	13.00
4	24.50	4-1	17.40
5	21.00	5-1	16.90
6	24.10	6-1	15.60
7	25.50	7-1	13.90
8	10.70	8-1	5.70
9	28.10	9-1	21.10
Mean	23.00		14.93
SD	4.98		4.22
Upper range	28.10		21.10
Lower range	10.70		5.70

Table 8. ANOVA table for oil percentage as affected by the extraction method.

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7768.19	1	7768.19	103.22	0.0000
Within groups	7977.79	106	75.26		
Total (Corr.)	15746.0	107			



Table 9. The Multi-Factorial variance analysis for the three factor model.

Analysis of Variance for oil % - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean Square	F-Ratio [†]	P-Value
MAIN					
EFFECTS					
A: trademark	4700.13	8	587.52	18.05	0.00
B: method	7768.19	1	7768.19	238.60	0.00
C: solvent	152.21	2	76.11	2.34	0.10
RESIDUAL	3125.45	96	32.56		
TOTAL					
(CORRECTED)	15746.0	107			

[†]All F-ratios are based on the residual mean square error

Table 10. ANOVA table for oil percentage as affected by trademarks.

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4700.13	8	587.52	5,27	0.0000
Within groups	11045.80	99	111.57		
Total (Corr.)	15746.0	107			



Figure 1

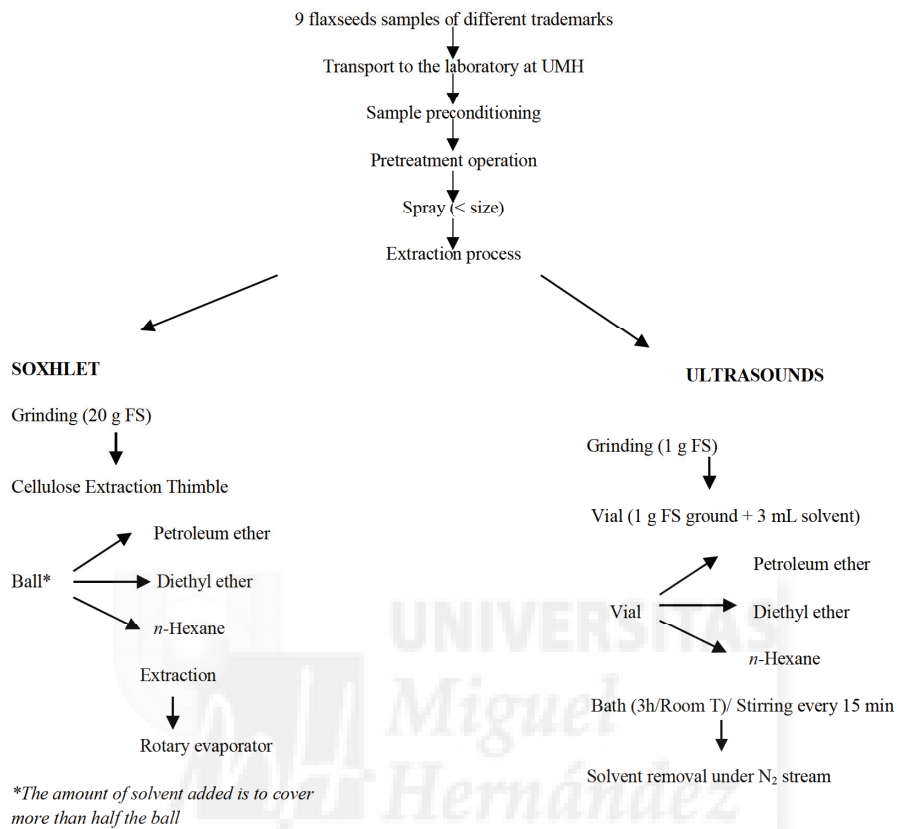


Figure 2

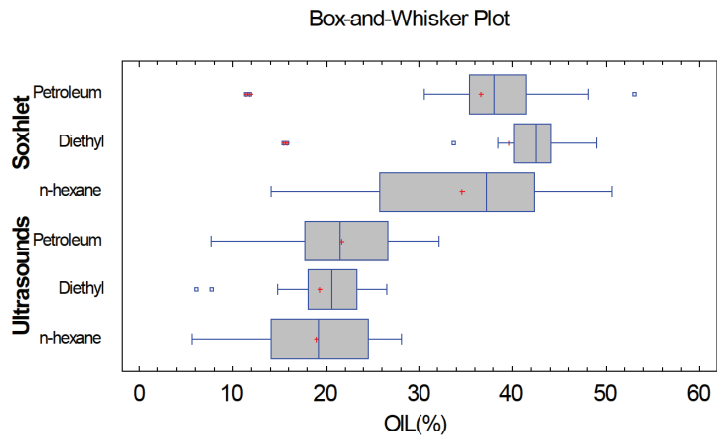


Figure captions

Figure 1. Flow diagram showing the two protocols used for the extraction of the oil from the flaxseed (FS) samples. Abbreviations used: T, temperature; UMH, University Miguel Hernandez.

Figure 2. Percentage of the fat content as affected by the extraction method (Soxhlet or ultrasounds) and the solvent (petroleum ether, diethyl ether and *n*-hexane).



HIGHLIGHTS

- Soxhlet method was more efficient in flaxseed oil extraction than ultrasounds.
- Soxhlet method provided better extraction results using diethyl ether as solvent.
- Ultrasound method provided better extraction results using petroleum ether as solvent.



**EFFECT OF FLAXSEED CONSUMPTION TOGETHER WITH A FISH-
ENRICHED DIET IN CIRCULATING LIPIDS OF HYPERLIPEMIC WOMEN:
A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL**

Running title: *Flaxseed and fish-rich diet in hyperlipemia*

**V.M. GARCÍA-HERNÁNDEZ^a, J. SÁNCHEZ-SORIANO^b, M.A. IBORRA-CAMPOS^a, E.
ROCHE^{c,d}, E. GARCÍA-GARCÍA^{a*}**

**^aDepartment of Applied Biology-Nutrition and Institute of Bioengineering,
Miguel Hernández University, Elche, Alicante (Spain).**

**^bU.I. Center of Operations Research (CIO). Miguel Hernández University,
Elche, Alicante (Spain).**

**^cDepartment of Applied Biology-Nutrition, University Miguel Hernandez,
Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL-FISABIO
Foundation), Alicante, Spain.**

**^dCIBERobn (Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición CB12/03/30038)
Instituto de Salud Carlos III, Spain.**

(*) To whom correspondence should be addressed:

Elena Garcia Garcia

Department of Applied Biology-Nutrition, Institute of Bioengineering

Avda de la Universidad sn. 03202-Elche (Alicante) SPAIN

Phone: 34965222005; Fax: 34965222033; e-mail: egarcia@umh.es

Keywords: Cardiovascular risk, fish-rich diet, flaxseed lignans, flaxseed oil, flaxseed supplementation, hyperlipemic woman.

A recent meta-analysis supported the idea that flaxseed consumption could reduce high levels of circulating cholesterol in women, but not triglycerides. The objective of this study was to increase the hypolipidemic effects of flaxseed by accompanying its consumption with an isocaloric fish-rich diet. Thus, a study was performed in a group of women aged 25-70 years presenting high levels of circulating cholesterol (> 200 mg/dL). Participants were randomly distributed into two groups which followed an isocaloric fish-rich diet during intervention. Group F consumed flaxseed, while group D did not. Body weight, systolic and diastolic pressures, circulating total cholesterol and triglycerides were determined at the beginning and end of a 30-day intervention. Consequently, group F presented significantly reduced total cholesterol and lower systolic and diastolic pressure compared to group D. A modest weight reduction was observed in group D. Triglycerides decreased in both groups with respect to their initial values. This study suggests that flaxseed supplementation performed in the context of a fish-rich diet helps to improve blood lipid parameters by reducing circulating cholesterol and triglycerides.

Flaxseed is an increasingly popular diet supplement due to the presence of 4 major components with important nutritional interest (GANORKAR & JAIN, 2013). Flaxseed presents a high percentage of fiber, both soluble and insoluble in a proportion between 20-40:80-60 respectively (MORRIS, 2001). The second component corresponds to lignans, a type of phytoestrogen, presenting the highest contents compared to other plant foods (13 mg/g of whole seed) (MADHUSUDHAN et al., 2000). Protein could be considered as the third component due (20-30% of seed weight) with a biological value of 77.5% and a high digestibility of almost 90% (SINGH et al., 2011). Finally, flaxseed

contains an outstanding amount of the essential fatty acid α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) and other ω -3 fatty acids.

Due to its unique nutritional composition, there is an increased interest in the scientific community to study potential health benefits of flaxseed, particularly in individuals with hyperlipemia at risk of developing cardiovascular diseases (CVD).

1. Materials and methods

1.1. Participants

The recruitment process began in November 2012. The intervention was carried out in March 2013 and lasted thirty days, with a subsequent monitoring of participants, ending in April-May 2013. Participant flow diagram is indicated in Figure 1.

Figure 1

Data from 133 women were processed by an initial test consisting of three brief questions in order to include them in the study: age 25-75 years old, presence of high circulating cholesterol (>200 mg/dL), and no taking currently any medication to control hypercholesterolemia. Individuals that met the selection criteria for the study were eligible (n= 64). Exclusion criteria were pregnancy and lactation, participation in another diet-supplement program, and cholesterol levels over 300 mg/dL. According to these criteria, a total of 69 women were excluded. The location where the women were recruited for the study was a pharmacy in the city centre of Elche. Elche is an industrial city located in the Southeast of Spain, with a population of 230,000 inhabitants. Volunteers (n= 64) that agreed to participate in the study signed a written consent. The study was approved by the Ethics Committee of University Miguel Hernández

(Reference number: IB-EGG-01-13). Volunteers were monitored using a survey on dietary intake and provided by a follow-up form for possible incidents and a non-compliance form if they wished to abandon the study. Parameters, including weight and blood pressure, were assessed on-site at the pharmacy office under standard conditions (GARCIA-HERNÁNDEZ et al., 2013). Total cholesterol, TG and glucose levels were measured in capillary blood with a Rapid Control Gauge on a Reflotron[®] Plus desktop analyser with serial number 5072278 (Roche, Barcelona, Spain). Fasting blood samples were obtained by capillary puncture between 9 and 11 AM, at the beginning (day 1) and end (day 30) of the study.

1.2. Trial design

The assignment of women to different groups was carried out following the classification criteria established by NCEP (2004), and performed by the research team. Women were randomly single-blindly assigned to one of the two parallel groups, in a 1:1 ratio. One group (n= 32) took 15 g of flaxseed daily, mixed in 125 g of skimmed yoghurt in the context of an isocaloric fish-rich diet (flaxseed group or F group). A second group (n= 32) was recruited as a comparison control group and consumed daily 125 g of skimmed yoghurt in the context of the same diet (diet group or D group). Therefore, the design was a parallel-group, randomized controlled trial, double-blind (participants and contact scientists were unaware who was taking the flaxseed or not) and conducted at the Miguel Hernández University of Elche (Spain).

1.3. Intervention

During a one-month intervention period, all participants attended in-person training sessions, receiving the flaxseed package (only F group), instruction manuals that

included a personal meal plan indicating the brand of skimmed yoghurt to purchase, recipes and information regarding physical activity. The amount of flaxseed (15 g) that was to be consumed in the yoghurt during breakfast was measured using a special spoon provided only to participants of F group. Body weight (Kg) and blood pressure (mmHg) were measured under standard conditions. The energy intake of the diet designed was similar in the two groups (ranging 1900-2000 Kcal/day), based on a previous study (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2013). The daily energy expenditure was calculated according to Harris-Benedict equation considering basal metabolism values plus an estimation for moderate daily physical activity (30-35% of basal metabolism).

1.4. Concluding guidelines

The only rule considered to prematurely conclude the study was in the case that there was a drastic decrease in sample size with respect to the necessary number of participants in order to obtain statistically significant results (see below). In addition, particular cases were excluded from the study due to different reasons (n=2 in group F and n= 14 in group D) (see Figure 1). Therefore, at the end of the intervention period the distribution of participants was as follows: n= 30 for group F and n= 18 for group D (Figure 1).

1.5. Theoretical estimation for sample size

Since we were interested in detecting sensitive variations in each of the variables measured of the lipid profile within each group after one month following flaxseed intake and diet, we considered a big (Cohen) effect size ($d = 1$), with a two-sided 5% significance level and a power of 80%. Using these variables, the minimum sample size to use was 16 women per group. On the other hand, to detect sensitive variations in each of the secondary variables between the two groups, considering again a big (Cohen)

effect size ($f = 0.5$), with a 5% significance level and a power of 80%, we obtained 17 women per group. The number of volunteers at the end of the study fitted with these theoretically calculated values: $n = 30$ (F group) and $n = 18$ (D group).

1.6. Statistical methods

Statistical analysis was carried out using STATGRAPHICS Centurion XV software (StatPoint Technologies, Inc. Warrington, VA, USA); likewise, significance was defined at $p < 0.05$. Data are reported as mean \pm standard error of the mean (sem). The homogeneity between the initial conditions of glucose, cholesterol, weight, systolic pressure and diastolic pressure of both groups were performed using the following parametric and non-parametric tests: t-test, W-test and K-S-test, the first for the difference of means, the second for the difference of medians and the last one for the difference of distributions. Intra-group statistical comparisons were performed using the following hypothesis tests, both parametric and non-parametric: t-test, sign test and signed rank test for paired samples.

2. Results and discussion

2.1. Outcomes

The main objective of the study was to assess the effect of consuming during one month 15 g/day of flaxseed mixed in yoghurt during breakfast and combined with a fish-enriched diet on blood total cholesterol and TG levels. The second objective was to assess the effect of the diet supplemented with 15 g of flaxseed on weight (kg), systolic (mmHg) and diastolic pressure (mmHg) after one month. Results indicated a significant decrease in total cholesterol and blood pressure in the F group. TG levels decreased very similarly in both groups.

2.2. Study of flaxseed consumption with yoghurt at breakfast

Groups F and D presented at the beginning of the study circulating total cholesterol levels above the healthy limits (>200 mg/dL). In this design, group D was considered as the control of group F, since it followed the same diet with the only difference that the flaxseed was omitted in the skimmed yoghurt ingested at breakfast.

2.3. Trial limitations

The limitations that the study presents stem from the Reflotron[®] Plus apparatus used to determine circulating parameters that could differ from the results obtained by blood analysis performed in certified laboratories.

2.4. External validity and applicability of the trial findings

The female participants in this study were frequent clients of one pharmacy located in Elche, a south-eastern Spanish city. Nevertheless, we can state that the results are applicable to women in urban environments, taking in account that lifestyles and eating habits are similar in most Spanish cities.

2.5. Discussion of results

This study assessed the effects of consuming 15 g of flaxseed with skimmed yoghurt during breakfast in the context of a fish-enriched diet. As a result, beneficial effects were observed regarding circulating lipid parameters, with a 10.7% reduction in total cholesterol in group F, effectively doubling the results observed in group D (Table 1). This suggests that flaxseed may potentiate the hypocholesterolemic effect exerted by diet. Regarding circulating TG levels, these were significantly reduced in both groups (around 25%) (Table 1), possibly due to the fish-enriched diet, as previously observed with a similar experimental population (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Table 1

Although the results obtained in the present study are coincident with data published by others (PAN et al., 2009), some particularities of this study should be taken in account in order to explain the beneficial effects observed for flaxseed consumption. These include: the moment of the day when flaxseed is consumed, the way that flaxseed is presented in diet, the amount of flaxseed consumed and the time duration for flaxseed consumption.

Regarding to the moment of the day chosen for intake, flaxseed is consumed during breakfast, a moment of the day that follows 8 h of sleeping, the longer fasting period of the day. This is a particular moment where the absorption of nutrients should be favored and thereby the beneficial effects of flaxseed could be better optimized, i.e. by reducing the amount of flaxseed administered.

The way how flaxseed is presented in the diet could be an instrumental point as well. From a nutritional point of view, flaxseed can be administered as a whole grain or milled. Whole grain can be easily digested in the human intestine, allowing the access to nutrients present in the seed (SINGH et al., 2011).

The daily dose administered is another instrumental aspect of the present study. MANDASESCU and co-workers (2005) found that doses as small as 20 g per day of grinded flaxseed for 60 days reduced total cholesterol by 17% in hypercholesterolemic adults. In the present study, we have reported hypocholesterolemic effects for a lower dose and during half the time.

Another key point of the study concerns which flaxseed component is the one responsible for the effects on cholesterol levels. We observed that flaxseed combined with a balanced isocaloric fish-rich diet was able to reduce TG levels, a point that has

not been confirmed in previous studies. Nevertheless, this effect could be due to diet since TG levels were reduced in a similar range in both groups. Altogether, these observations suggest that flaxseed consumption, in conjunction with a fish-rich diet, contributes to the stabilization of a circulating lipid profile in terms of total cholesterol and TG, as opposed to a usual unbalanced diet where only cholesterol reduction was observed (PAN et al., 2009).

Another interesting finding was the lowering of the systolic and diastolic blood pressure (BP) in F group (Table 2). Evidence indicates that ω -3 in flaxseed can stimulate endothelial production of NO that relaxes the smooth muscles, allowing dilatation of blood vessels, which in turn reduces BP (POUDYAL et al., 2013). BP lowering is beneficial, because a systolic BP value of 20 mmHg above normal levels doubles the risk of death due to CVD. Regarding body weight (Table 2), significant but modest changes were observed in group D, likely due to the design of an isocaloric diet.

Table 2

3. Conclusions

The inclusion of 15 g of flaxseed in yoghurt in the context of a daily hypolipemic fish-rich diet lowered total cholesterol, TG and BP in women with hyperlipemia.

*The study was carried out in the Pharmacy of M^a Asunción Iborra Campos. Authors want to thank to Pepa Garry for providing the flaxseed samples used in this study. ER is a member of the CIBERObn (Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición CB12/03/30038), Instituto de Salud Carlos III (Spain). ER is recipient of a grant (PROMETEO/2016/006) from Generalitat Valenciana (Spain).

References

- GANORKAR P.M. and JAIN R.K. (2013); Flaxseed, a nutritional punch; *Int. Food Res. J.*; 20, 519-525.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ V.M., GALLAR M., SÁNCHEZ-SORIANO J., MICOL V., ROCHE E. and GARCÍA-GARCÍA E. (2013); Effect of omega-3 dietary supplements with different oxidation levels in the lipidic profile of women: a randomized controlled trial; *Int. J. Food Sci. Nutr.*; 64, 993-1000.
- MADHUSUDHAN B., WIESENBORN D., SCHWARTZ J., TOSTENSON K. and GILLESPIE J. (2000); A dry mechanical method for concentrating the lignin secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed; *Lebenson Wiss Technol.*; 33, 268-275.
- MANDASESCU S., MOCANU V., DĂSCALITA A.M., HALIGA R., NESTIAN I., SITT P.A. and LUCA V. (2005); Flaxseed supplementation in hyperlipidemic patients; *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*; 109, 502-506.
- MORRIS D.H. (2001); Essential nutrients and other functional compounds in flaxseed; *Nutr. Today*; 36, 159-162.
- PAN A., YU D., DEMARK-WAHNEFRIED W., FRANCO O.H. and LIN X., (2009); Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids; *Am. J. Clin. Nutr.*; 90, 288-297.
- POUDYAL H., KUMAR S.A., IVER A., WAANDERS J., WARD L.C. and BROWN L. (2013); Responses to oleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats; *J. Nutr. Biochem.*; 24, 1381-1392.
- SINGH K.K., MRIDULA D., REHAL J. and BARNWAL P. (2011); Flaxseed: A potential source of food, feed and fiber; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; 51, 210-222.

Table 1: Changes in circulating parameters of volunteers at the beginning (day 1) and at the end (day 30) of the study. Results are expressed as means \pm sem.

Parameter	Group F (day 1)	Group F (day 30)	Group D (day 1)	Group D (day 30)
Glucose (mg/dL)	85.8 \pm 3.5	88.9 \pm 2.5	99.7 \pm 4.6	101.3 \pm 3.6
Cholesterol (mg/dL)	241.5 \pm 4.9	215.9 \pm 6.1*	236.8 \pm 4.2	227.2 \pm 6.1
Triglycerides (mg/dL)	205.7 \pm 12.2	153.6 \pm 11.0*	192.6 \pm 17.1	144.4 \pm 11.1*

*Statistically significant difference with respect to day 1, $p < 0.05$

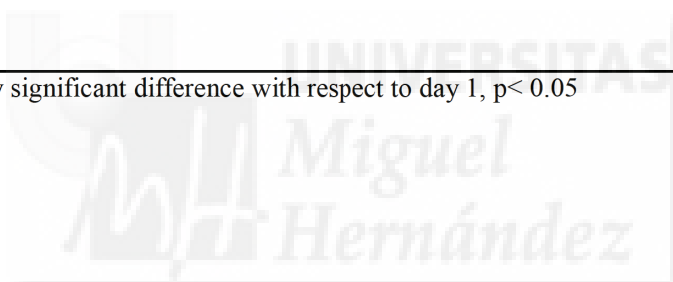


Table 2: Weight and blood pressure changes of volunteers at the beginning (day 1) and at the end (day 30) of the study. Results are expressed as means \pm sem.

Parameter	Group F (day 1)	Group F (day 30)	Group D (day 1)	Group D (day 30)
Weight (kg)	77.1 \pm 0.7	76.9 \pm 0.7	75.3 \pm 1.1	74.8 \pm 1.2*
Systolic pressure (mmHg)	124.6 \pm 0.1	119.7 \pm 0.5*	124.7 \pm 0.9	124.1 \pm 0.8
Diastolic pressure (mmHg)	75.9 \pm 0.7	73.6 \pm 0.8*	74.7 \pm 0.8	74.6 \pm 0.2

*Statistically significant difference with respect to day 1, $p < 0.05$

