



Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia

**VARIACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS E
IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO PINOLÉNICO EN TEJIDOS
MURINOS, EN RESPUESTA A LA ADMINISTRACIÓN
CRÓNICA CON SUPLEMENTO A BASE DE ACEITE DE
*PINUS RADIATA***

POR ALEXANDER ELISEO ORELLANA GARCÍA

Tesis presentada en Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar
al título profesional de Bioquímico

Profesor guía y patrocinante:

Dr. Daniel Durán Sandoval
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Marzo, 2021
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	III
INDICE DE ILUSTRACIONES	V
INDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. La obesidad en Chile	12
1.2. Tratamientos para combatir la obesidad.	14
1.2.1. Tratamientos alternativos: Aceite de pino.	16
1.3. Estudios preliminares sobre el ácido pinolénico	20
1.4. Generalidades de la absorción y distribución de ácidos grasos en el organismo.	23
1.5. Utilización de semillas de <i>Pinus radiata</i> : Suplemento D.	25
2. HIPÓTESIS	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo general.	30
3.2. Objetivos Específicos.	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1. Muestras de tejido.	31

4.2.	Selección de muestras y grupos a analizar.	32
4.3.	Extracción de ácidos grasos desde tejidos aislados.	34
4.3.1.	Realización de <i>batch</i> control para cada tejido.	34
4.4.	Derivatización de ácidos grasos.	35
4.5.	Análisis de tejidos por GC/MS.	36
4.5.1.	Análisis estándar de ácido pinolénico.	37
4.5.2.	Secuencia de análisis de muestras.	38
5.	RESULTADOS	40
5.1.	Estandarización del protocolo.	40
5.2.	Estándar de ácido pinolénico.	41
5.3.	Análisis de hígado.	42
5.4.	Análisis de músculo esquelético.	46
5.5.	Análisis de tejido adiposo visceral.	50
5.6.	Análisis de tejido adiposo subcutáneo.	54
5.7.	Análisis de duodeno.	58
6.	DISCUSIÓN	62
7.	CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	67
8.	GLOSARIO	69
9.	BIBLIOGRAFÍA	70
10.	ANEXO I: PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTOS DE DESECHOS BIOLÓGICOS Y/O QUÍMICOS	75

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Sobrepeso y obesidad en Chile.	13
Figura 2. Mecanismo de acción del ácido pinolénico.	18
Figura 3. Aceite de pino disminuye contenido hepático de triglicéridos.	19
Figura 4. SupD reduce la ganancia en peso.	27
Figura 5. Diseño experimental <i>in vivo</i> .	32
Figura 6. Análisis cromatográfico de ácido pinolénico.	41
Figura 7. Identificación de ácido pinolénico en tejido hepático.	43
Figura 8. Espectro de masas de <i>peak</i> con retención similar a ácido pinolénico en tejido hepático.	44
Figura 9. Cromatogramas comparativos en hígado (estándar).	45
Figura 10. Cromatogramas comparativos en hígado.	45
Figura 11. Identificación de ácido pinolénico en tejido muscular esquelético.	47
Figura 12. Espectro de masas de <i>peak</i> con retención similar a ácido pinolénico en tejido muscular esquelético.	48
Figura 13. Cromatograma comparativo en músculo esquelético (estándar).	49
Figura 14. Cromatograma comparativo en músculo esquelético.	49
Figura 15. Identificación de ácido pinolénico en tejido adiposo visceral.	51
Figura 16. Espectro de masas de <i>peak</i> con retención similar a ácido pinolénico en tejido adiposo visceral.	52
Figura 17. Cromatograma comparativo en tejido adiposo visceral (estándar).	53
Figura 18. Cromatograma comparativo en tejido adiposo visceral.	53
Figura 19. Identificación de ácido pinolénico en tejido adiposo subcutáneo.	55
Figura 20. Espectro de masas de <i>peak</i> con retención similar a ácido pinolénico en tejido adiposo subcutáneo.	56
Figura 21. Cromatograma comparativo en tejido adiposo subcutáneo (estándar).	57
Figura 22. Cromatograma comparativo en tejido adiposo subcutáneo.	57
Figura 23. Identificación de ácido pinolénico en duodeno.	59

Figura 24. Espectro de masas de <i>peak</i> con retención símil a ácido pinolénico en duodeno.	60
Figura 25. Cromatograma comparativo en duodeno (estándar).	61
Figura 26. Cromatograma comparativo en duodeno.	61
Figura 27. Espectro de masas de ácido (5Z, 9Z, 12Z) -octadeca-5,9,12-trienoico.	63
Figura 28. Modelo preliminar de distribución de ácido pinolénico en el organismo.	66



INDICE DE TABLAS

4-1. Diseño de análisis de muestras

39



RESUMEN

La obesidad es una enfermedad de alta prevalencia en el mundo, y particularmente en nuestro país. Existen diversos tipos de tratamientos para combatirla, los cuales van desde cambios hacia una alimentación más saludable sumado a actividad física, hasta medicación y cirugía en los casos extremos.

Estudios han demostrado que la suplementación oral con aceite de semillas de pino posee efectos positivos en la inhibición del apetito, disminución de grasa y un aumento en la sensibilidad a la insulina, entre otros beneficios en obesidad. Este aceite contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, siendo uno de los más característicos el ácido pinolénico (PLA), al que se le ha atribuido parte de los efectos biológicos del aceite de semillas de pino. Sin embargo, no se ha demostrado si la administración oral de este aceite permite el enriquecimiento tisular con PLA *in vivo*.

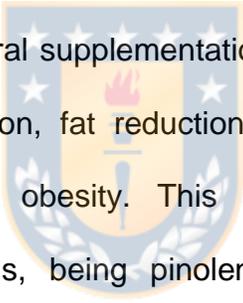
En este trabajo se realizó una evaluación preliminar de la distribución *in vivo* de PLA, analizando por GC/MS el perfil de ácidos grasos de tejidos aislados desde roedores obesos sometidos a una dieta alta en grasas suplementada con aceite de semillas de *Pinus radiata*. Los resultados sugieren que el PLA llega a

formar parte de la composición lipídica de los tejidos analizados. Esto establece por primera vez el enriquecimiento *in vivo* de tejidos con PLA tras administración oral de aceite de semillas de pino, aportando a la comprensión de los mecanismos asociados a los efectos benéficos del consumo de aceite de semillas de pino en obesidad.



ABSTRACT

Obesity is a highly prevalent disease worldwide, and particularly in our country. There are several alternatives of treatment, ranging from changes to a healthier diet coupled with physical activity, to medication and surgery in extreme cases.



Studies show that oral supplementation with pine seeds oil, has positive effects on appetite inhibition, fat reduction and increased insulin sensitivity, among other benefits in obesity. This oil contains a large amount of polyunsaturated fatty acids, being pinolenic acid (PLA) one of the most characteristic, to which part of the biological effects of pine seed oil has been attributed. However, it has not been demonstrated if oral administration of this seed oil allows tissue enrichment with PLA *in vivo*.

In this thesis, a preliminary evaluation of the *in vivo* distribution of PLA was carried out, analyzing the fatty acid profile of tissues isolated from obese rodents subjected to a high-fat diet supplemented with *Pinus radiata* seed oil by GC / MS method. The results suggest that PLA becomes part of the lipid composition of the analyzed tissues. This establishes for the first time the *in vivo* enrichment of

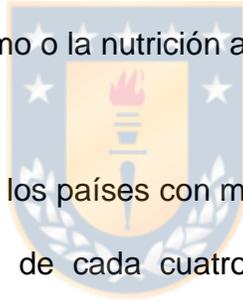
tissues with PLA after oral administration of pine seed oil, contributing to the understanding of the mechanisms associated with the beneficial effects of the consumption of this oil in obesity.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. La obesidad en Chile

La obesidad es una enfermedad que se hace cada vez más prevalente en la sociedad actual. Es considerada una patología multifactorial, ya que puede ser causada por distintos motivos, destacando las causas genéticas, metabólicas, psicológicas, el sedentarismo o la nutrición altamente calórica.



Chile está dentro de los países con mayor índice de sobrepeso infantil de la región, en el cual uno de cada cuatro niños se ve afectado, siendo la prevalencia de obesidad más alta en escuelas municipales (Vio, 2018). El Ministerio de salud, en pos de obtener información acerca del estado nutricional actual de los chilenos, realizó la 3era Encuesta Nacional de Salud (MINSAL, 2017) obteniendo cifras preocupantes, donde destaca que más del 70% de la población evidencia problemas de peso, desde sobrepeso hasta obesidad mórbida (Figura 1).

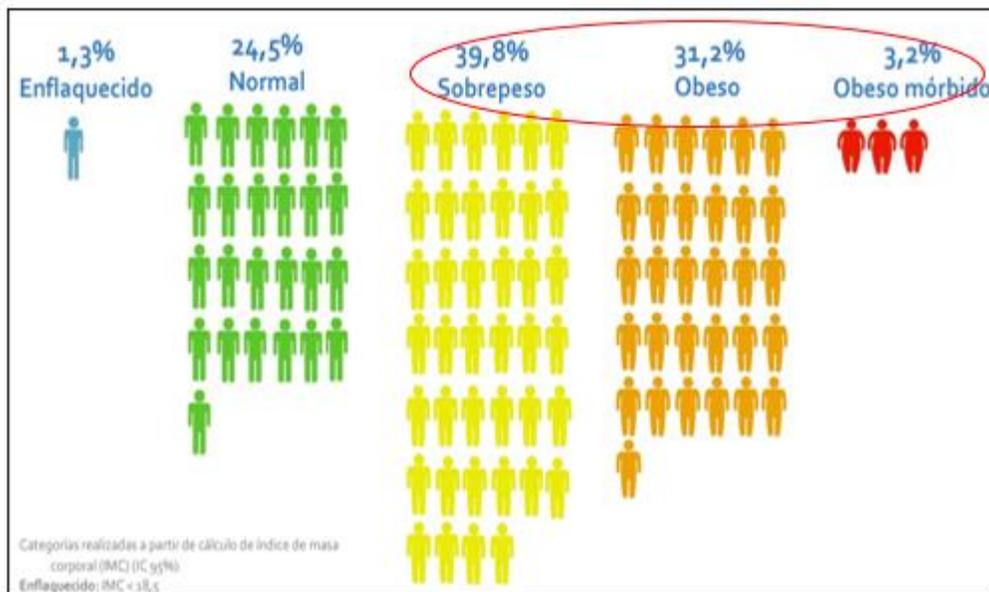


Figura 1. Sobrepeso y obesidad en Chile.

Diagrama representativo del estado nutricional de los chilenos en el año 2017. Fuente: MINSAL (2017).

Una definición de la obesidad, acorde al contexto de este trabajo, sería la descrita por Pasca y Montero (2016), quienes la consideran como una enfermedad sistémica, multiorgánica, metabólica e inflamatoria crónica, multideterminada por la interrelación entre lo genómico y lo ambiental, fenotípicamente expresada por un exceso de grasa corporal (en relación con la suficiencia del organismo para alojarla), que conlleva un mayor riesgo de morbimortalidad.

Se ha logrado relacionar a la obesidad con una mayor prevalencia de comorbilidades, tales como diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólico, e

hipertensión (Mandviwala T, *et al.* 2016). Además, la obesidad se encuentra estrechamente ligada al desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis (Sharma A. *et al.* 2007).

Generalmente se asocian los problemas de peso a las enfermedades mencionadas anteriormente. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que la obesidad podría ser incluso un factor de riesgo para distintos tipos de cáncer, entre los que destacan cáncer endometrial, adenocarcinoma, cáncer esofágico, colorrectal, de próstata y renal. Se estima que el número de casos causados por obesidad sería alrededor del 20%, debido al tipo de dieta, distribución de grasa corporal, y la deficiente actividad física (De Pergola & Silvestris. 2013).

1.2. Tratamientos para combatir la obesidad.

Dado lo mencionado anteriormente, es importante manejar una amplia gama de opciones para combatir una de las enfermedades más prevalentes en el mundo actual. La actividad física se recomienda tanto para prevenir la obesidad como para tratarla, siempre combinada con una dieta adecuada a las necesidades del individuo. Se utiliza el ejercicio físico con el fin de obtener un balance energético negativo, en conjunto con una disminución del consumo de

calorías, para así lograr un cambio de estilo de vida y una disminución de grasa corporal (Chin S, et al. 2016). Sin embargo, en muchos casos los pacientes no logran adherirse a este nuevo estilo de vida, desestimando las recomendaciones médicas en pos de su salud.

Es importante mencionar también las terapias farmacológicas disponibles actualmente para combatir la obesidad y los problemas de peso, donde principalmente destacan los medicamentos aprobados por la FDA fentermina, dietilpropión y orlistat (Álvarez V, 2012). Sin embargo, existen casos donde los métodos mencionados anteriormente no son eficaces, en los cuales es necesario recurrir a intervenciones quirúrgicas. Se consideran elegibles para este procedimiento a pacientes con IMC igual o mayor de 40 kg/m², o con IMC igual o mayor de 35 kg/m² asociado a condiciones médicas relevantes como diabetes mellitus tipo II, hipertensión arterial, dislipidemias, cardiopatía coronaria, entre otros (Carrasco F, et al. 2009).

Si bien las terapias mencionadas anteriormente son las más utilizadas y aceptadas en la actualidad, no podemos descartar la inclusión de nuevos tratamientos no farmacológicos diferentes a la modificación alimentaria y la actividad física. Si hablamos de terapias alternativas, debemos destacar el rol que cumplen los alimentos funcionales en la sociedad actual. Según Cruzado y Cedrón (2012), un alimento funcional es aquel alimento que se consume como

parte de una dieta normal y que contiene ciertos compuestos que son beneficiosos para la salud.

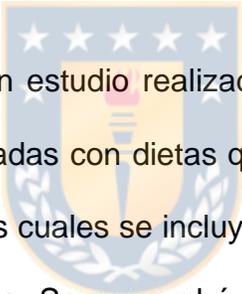
En este mismo contexto, es importante introducir también el concepto de nutracéutico, que se define como un suplemento dietético concentrado, hecho a partir de una sustancia natural bioactiva presente en los alimentos, proporcionando un efecto beneficioso superior sobre el organismo en comparación al alimento del que proviene (Cruzado y Cedrón, 2012).



1.2.1. Tratamientos alternativos: Aceite de pino.

Es sabido que el aceite de *Pinus koraiensis* (pino coreano) es utilizado en el continente asiático como un aditivo en las comidas, atribuyéndole efectos beneficiosos para el organismo (Xie K, *et al.* 2016). Se ha demostrado en humanos, que el aceite de pino coreano actúa sobre la secreción de CCK y GLP-1. Al actuar sobre CCK, se ralentizaría el vaciado del estómago, provocando una sensación de saciedad (Pasman WJ, *et al.* 2008). Su acción sobre GLP-1 se asocia a la ralentización de la absorción alimentaria, provocando sensación de saciedad y eliminación de un deseo de volver a comer (Frantisek y Meuselbach, 2010). Además de esto, existen diversos estudios que complementan la información disponible acerca del aceite de *Pinus koraiensis* y sus efectos.

Se sabe que el aceite de pino coreano puede disminuir la ganancia de peso en modelos murinos de obesidad inducida por dieta (HFD), considerando que también existe una mejoría en un ámbito inmunológico. Aquellos ratones bajo HFD y suplementados con aceite de *Pinus koraiensis*, resultaron con un aumento de peso significativamente menor (17%) respecto a controles, debido principalmente a una disminución de la masa de tejido adiposo blanco. Esto se asoció con una mejora global en la proliferación de esplenocitos y una mayor producción de IL-1B (Park, *et al.* 2013).



Por otra parte, en un estudio realizado en 1994, ratas *Sprague-Dawley* hipertensas fueron alimentadas con dietas que contenían 100 g de grasa y 5 g de colesterol por kilo, en las cuales se incluyó aceite de *Pinus koraiensis*, aceite de linaza, cártamo y onagra. Se comprobó que el aceite de pino disminuyó la agregación plaquetaria inducida por ADP, además de aumentar la producción de prostaciclina aórtica, resultando en la atenuación de la presión arterial después de 5 semanas de alimentación (Sugano, *et al.* 1994).

Estudios recientes en la universidad de Ulsan, en Corea del Sur, han demostrado que la suplementación con aceite de pino coreano en roedores sometidos a una dieta alta en grasas, influyó aumentando el metabolismo oxidativo mitocondrial en el músculo esquelético y en el tejido adiposo marrón. Se comparó con la ingestión de aceite de soja (*Glycine max*), donde se encontró

una disminución en la ganancia de peso y la acumulación intramuscular de lípidos. Se observó una regulación transcripcional positiva relacionada al metabolismo oxidativo y la fosforilación de la proteína kinasa activada por AMP, que es el mayor regulador de la beta oxidación. Estos efectos beneficiosos se asociaron a una propuesta actividad doble ligando sobre PPAR α /PPAR δ del ácido pinolénico (Figura 2), un componente característico del aceite de pináceas (Le, *et al.* 2012).

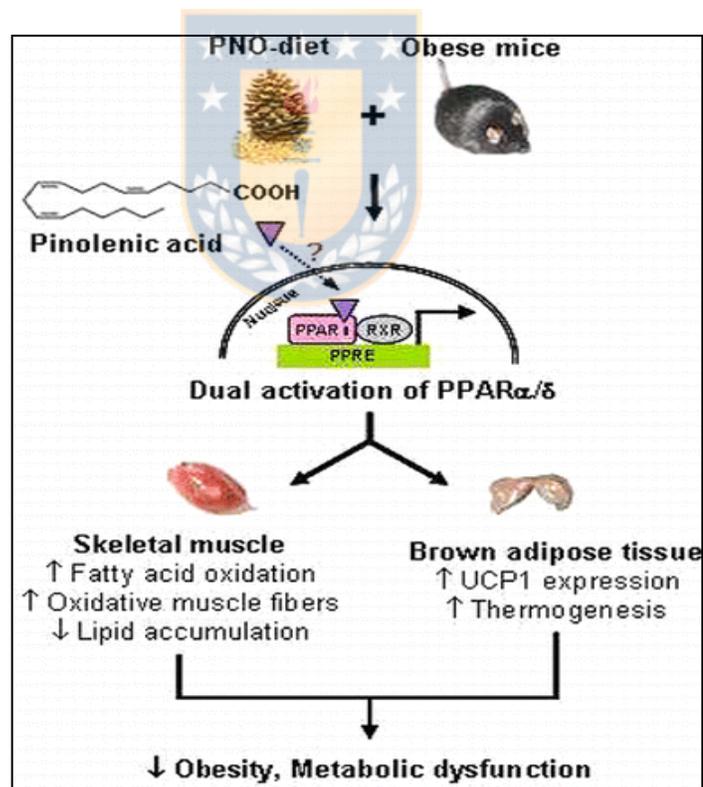


Figura 2. Mecanismo de acción del ácido pinolénico.

A partir de los efectos *in vivo* observados en un modelo murino de obesidad inducido por dieta HFD (High Fat Diet) suplementado con aceite de pino coreano (PNO: Pine Nut Oil), se propone un mecanismo de acción *in vitro* de PNO como agonista dual de PPAR α y PPAR δ sobre músculo esquelético (skeletal muscle) y tejido adiposo pardo (brown adipose tissue). Fuente: Le, *et al.* 2012.

En el año 2016, se realizaron experimentos en roedores machos de la cepa C57BL/6, los cuales también fueron sometidos a dietas altas en grasa, complementadas con aceite de *Pinus koraiensis* y aceite de soja. Fueron alimentados de esta manera con el objetivo de comparar el efecto de ambos aceites sobre el contenido hepático de triglicéridos (Figura 3), aumento de peso corporal y la masa de tejido adiposo blanco. Los resultados evidenciaron que ambos parámetros fueron menores en roedores suplementados con aceite de pino (10% y 18% menos respectivamente), en comparación a aceite de soja. Los niveles de triacilglicéridos hepáticos también fueron menores en un 26% en comparación al aceite de soja (Park, *et al.* 2016).

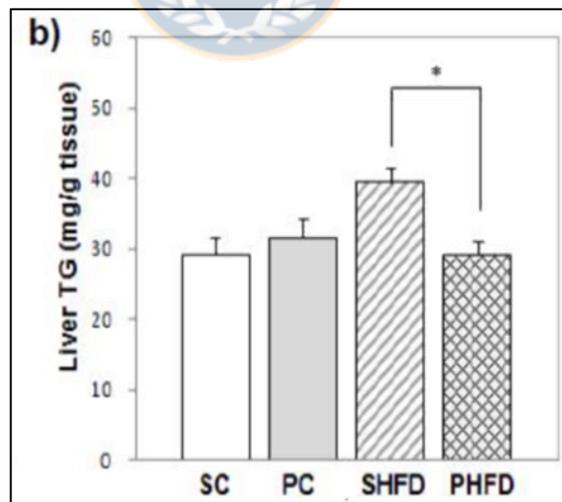


Figura 3. Aceite de pino disminuye contenido hepático de triglicéridos.

Roedores machos de la cepa C57BL/6, sometidos a una dieta alta en grasas HFD, suplementada con aceite de *Pinus koraiensis* (PHFD) tras 12 semanas evidenciaron una disminución significativa del contenido hepático de triglicéridos en comparación con roedores suplementados con aceite de soja (SHFD). SC = Control aceite de soja; PC = Control aceite de pino. * $p < 0.05$. Fuente: Park, *et al.* 2016.

Sumado a lo anterior, existe data sobre los efectos del aceite de pino coreano en el metabolismo lipídico intestinal en similares condiciones alimentarias. El uso de aceite de pino en la dieta podría funcionar en la prevención de la captación excesiva de lípidos en el intestino, observándose una expresión significativamente más baja de ARNm de CD36, un importante receptor que participa en la captación de ácidos grasos a nivel duodenal, lo que podría asociarse a una disminución de la absorción de ácidos grasos en el intestino y el posterior ensamblaje de quilomicrones (Zhu, *et al.* 2016).



1.3. Estudios preliminares sobre el ácido pinolénico

El ácido pinolénico, es un ácido graso poliinsaturado (PUFA), cuyo peso molecular es de 278.4296 g/mol. Se encuentra presente en el aceite de pino, específicamente en la semilla de pináceas (Xie K, *et al.* 2016).

La compañía transnacional “Lipid Nutrition” tiene en el mercado actualmente un producto nutracéutico llamado “PinnoThin™”, que es un extracto lipídico obtenido precisamente de semillas de *P. koraiensis*, el cual se ha comercializado alrededor del mundo incluso en nuestro país, contando como principal característica su capacidad de inducir la saciedad en el individuo que lo consume, basándose en los estudios mencionados anteriormente. Dentro de los

ácidos grasos poliinsaturados más relevantes que lo componen, se encuentra el ácido linoleico (46%) y el ácido pinolénico (15%), este último siendo el compuesto de interés en el presente trabajo (Hughes G, *et al.* 2008).

Desde el punto de vista químico, el ácido pinolénico es un isómero del ácido gamma-linoleico. A pesar de que el ácido pinolénico no es un ácido graso esencial, puede formar metabolitos biológicamente activos en presencia de lipooxigenasa o ciclooxigenasa (Chuang, *et al.* 2009).

Por otra parte, se evidencia la acción beneficiosa del ácido pinolénico a nivel pancreático. FFA1 y FFA4 pertenecen a la familia de receptores de ácidos grasos libres. El receptor FFA1 se ha relacionado con el aumento de la secreción de insulina estimulada por glucosa, mientras que FFA4 se asocia con efectos antiinflamatorios y de sensibilización a la insulina. La expresión de ambos receptores protege los islotes pancreáticos y promueve la secreción de hormonas reguladoras del apetito y la glucosa. Se analizó el efecto del ácido pinolénico sobre estos receptores, comparándolo con el de aceite de maíz y aceite de pino, mostrando una mejora significativa como agonista dual, ejerciendo potenciales efectos antidiabéticos en roedores (Christiansen, *et al.* 2015).

Sin embargo, no solo existe evidencia de las bondades del ácido pinolénico en cuanto a sus efectos mencionados, ya que se ha investigado su rol

como supresor de la metástasis del cáncer de mama. MDA-MB-231 es una de las líneas celulares más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama, las cuales fueron empleadas para evaluar el efecto del ácido pinolénico en la proliferación de estas células. Se observó que el compuesto no afecta la viabilidad de estas células, ni su adhesión a la matriz celular. Sin embargo, inhibe la metástasis al suprimir la invasividad celular y la motilidad de éstas. Esta evidencia podría explicarse debido a la modificación de los PUFA's n-6 de las células por el ácido pinolénico, ya que disminuye la presencia de ácido araquidónico en los fosfolípidos de un 12,6% a 4,9%, lo cual es importante ya que se vería reflejado en una menor síntesis de Prostaglandina E2 y en una subsiguiente regulación negativa a la expresión de COX2 (Chen, *et al.* 2011).

El organismo animal está capacitado para biotransformar los alimentos que ingiere. En el caso particular de los ácidos grasos poliinsaturados, los puede transformar en ácidos grasos esenciales. Un estudio realizado en Japón refleja lo anterior, dado que el tratamiento de células animales con ácido sciadónico, presente en semillas de coníferas, provoca la variación de los niveles de ácido linoleico, ya que es degradado aumentando las cantidades este último (Tanaka, *et al.* 2007). Este estudio resulta interesante, debido a que llama a considerar la biotransformación como una alternativa en la variación del perfil de ácidos grasos en los roedores suplementados de esta investigación.

1.4. Generalidades de la absorción y distribución de ácidos grasos en el organismo.

En términos generales, el proceso de absorción y distribución de los ácidos grasos ingeridos en la dieta está dado principalmente en el intestino delgado para ácidos grasos de cadena mediana y larga. Sin embargo, el proceso digestivo comienza en la boca, donde se forma el bolo alimenticio y los lípidos se encuentran con la lipasa lingual. El bolo, al llegar al estómago, se emulsiona levemente gracias a su acción agitadora. Posteriormente se realiza la apertura del esfínter de Oddi, que liberará los ácidos biliares provenientes de la vesícula biliar al duodeno, para la emulsión total de las grasas y la formación de micelas (Buttet, *et al.* 2014).



En el intestino el páncreas libera enzimas, la más destacada es la lipasa pancreática, la cual se encarga de la hidrólisis de las micelas, obteniéndose ácidos grasos libres y glicerol. Los enterocitos son células altamente polarizadas; su membrana apical presenta propiedades específicas que la distinguen de la membrana basolateral, al punto que la presencia de microvellosidades en el lado apical mejora en gran medida la superficie de absorción del intestino delgado. Se ha comprobado que la zona donde están estas vellosidades presenta un pH bajo, creando un microclima ácido que participa en la disociación micelar y la protonación de los ácidos grasos de cadena larga, facilitando así su absorción por difusión pasiva. Estos productos una vez dentro del enterocito, volverán a

componer moléculas de triacilgliceroles, para su posterior ensamblaje en un quilomicrón junto a sus apolipoproteínas (Buttet, *et al.* 2014).

Una vez formado el quilomicrón, este viaja por la circulación linfática para llegar al torrente sanguíneo, donde distribuirá los ácidos grasos a los tejidos periféricos que lo necesiten, proceso mediado por la enzima Lipoproteinlipasa que se encuentra en el endotelio y es activada por la apolipoproteína CII, presente en el quilomicrón. Los ácidos grasos libres provenientes de la hidrólisis del quilomicrón ingresarán a su célula objetivo, ya sea para ser almacenados, o para ser oxidados e ir al ciclo cítrico (Buttet, *et al.* 2014).

El proceso descrito anteriormente es genérico para los ácidos grasos. Sin embargo, no podemos asegurar que el ácido pinolénico siga estrictamente la misma vía. De hecho, actualmente no existen estudios que nos den información acerca de la absorción, biodistribución y metabolización del ácido pinolénico *in vivo*. Le (2012), realizó una investigación la que describe un efecto beneficioso de la suplementación crónica con aceite de *Pinus koraiensis* sobre el metabolismo oxidativo del músculo esquelético, contribuyendo a la reducción de la obesidad y la disfunción metabólica. Por otra parte, utilizando un cultivo celular de mioblastos C2C12 para evaluar *in vitro* el efecto directo del ácido pinolénico sobre células musculares, este mismo autor evidenció resultados que coinciden con el efecto *in vivo* observado sobre el metabolismo oxidativo muscular.

1.5. Utilización de semillas de *Pinus radiata*: Suplemento D.

En base a los estudios y la información mencionados anteriormente, resultaría interesante determinar la manera en que el ácido pinolénico ejerce su acción en el organismo. Por una parte, se conocen los efectos beneficiosos que éste produce *in vitro*, los cuales se han extrapolado a explicar su acción en el organismo. Sin embargo, no hay información publicada sobre la acción directa y específica de este ácido poliinsaturado *in vivo*. Además, es importante resaltar el hecho de que la mayoría de las publicaciones que están disponibles sobre el tema hoy en día provienen de Asia, utilizando la especie *P. koraiensis* como la única fuente de ácido pinolénico.

A raíz de esto se genera la idea de verificar uso de las semillas de *Pinus radiata* como un potencial sustrato para la realización de un producto de similares características a PinnoThin™.

A nivel nacional, el *Pinus radiata* representa el 54,2% de la superficie reforestada según las estadísticas de la Corporación Nacional Forestal (CONAF, 2018). En cualquier tipo de industria, paralelo a los productos principales que se generan, se van produciendo residuos de menor o nulo valor comercial, los cuales pueden ser trabajados para obtener utilidades distintas y aprovechar sus beneficios. Un ejemplo de esto, precisamente en la industria de la madera, es lo

que sucede con el aserrín, el cual es un residuo del trozado de la madera, producido en grandes volúmenes y, luego de determinados procesos, termina siendo un producto aprovechado con un valor comercial. Considerando lo anterior, sería de gran utilidad otorgar un fin productivo a otros residuos de esta industria, tales como las semillas de pino.

Existe variedad de semillas de pino introducidas en Chile, tales como *Pinus pinaster*, *Pinus pinea* y la ya mencionada *Pinus radiata*. De estas tres especies, *P. radiata* es la que mejor rendimiento presenta en el contexto de esta investigación, además de ser la más cultivada en nuestro país (Díaz. 2013).

Bajo este contexto, gracias a financiamiento CONICYT (Proyecto FONDEF D 11i1067) se desarrolló un producto a base de aceite de semillas de *Pinus radiata* denominado “Suplemento D” (SupD), el cual busca enfocar su potencial efecto contra la obesidad en el mercado actual.

El año 2018, se realizó un estudio que comparaba la eficacia de SupD con su símil Pinnothin™, con el objetivo de evaluar *in vivo* la ganancia en peso en un modelo murino HFD. Para realizar esta investigación, se utilizaron roedores hembra C57BL/6 HFD, las cuales fueron suplementadas con aceite de soja (como control negativo), 15% p/p con Pinnothin™, y 15% p/p con SupD, desarrollado en base a aceite de pino radiata (Rojas D. 2018). Los resultados

fueron contundentes, demostrando la superioridad de SupD en comparación a Pinnothin™ en cuanto a la disminución de ganancia en peso de los roedores, evidenciado principalmente por su diferencia en masa de tejido adiposo visceral (Figura 4).

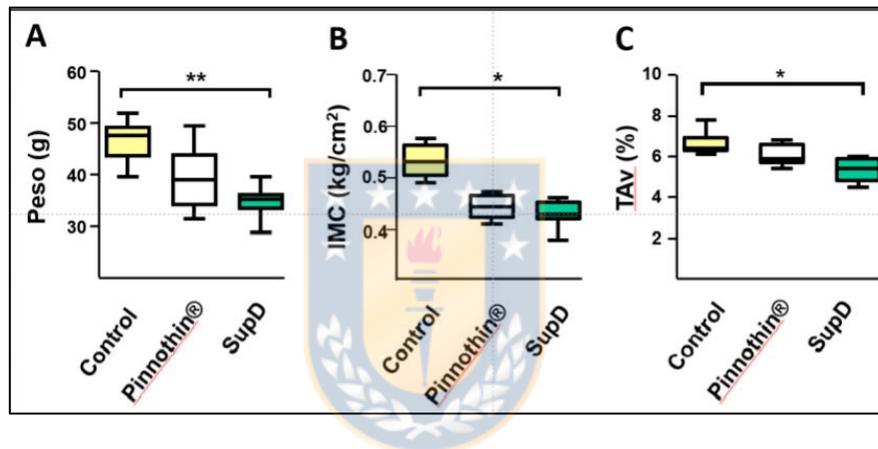


Figura 4. SupD reduce la ganancia en peso.

Se esquematiza el efecto de SupD en roedores hembras de la cepa C57BL/6 alimentadas *ad-libitum* con HFD suplementada con 15% p/p aceite de *Glycine max*, 15% p/p Pinnothin® (suplemento en base a aceite de pino coreano) o 15% p/p SupD (suplemento a base de aceite de pino radiata). (A) Efecto sobre el peso total (Peso), (B) Efecto sobre el índice de masa corporal (IMC), (C) Efecto sobre la masa porcentual de tejido adiposo visceral (TAV). * p < 0,05; ** p < 0,01. Fuente = Informe Proyecto FONDEF D 11i1067.

En términos específicos, el presente estudio se centró en realizar un análisis comparativo de la variación del perfil de ácidos grasos en tejidos aislados desde roedores alimentados por 4 meses con una dieta alta en grasas suplementada con SupD, producto a base a aceite de *Pinus radiata*, evaluada

respecto a controles. Con esto se espera obtener información relevante para identificar la presencia de ácido pinolénico en los tejidos mencionados.



2. HIPÓTESIS

El consumo crónico de SupD, suplemento a base de aceite de semillas de *Pinus radiata*, en un modelo murino de obesidad inducido por dieta, enriquece los tejidos con ácido pinolénico *in vivo*.



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Identificar la presencia de ácido pinolénico en tejidos aislados desde ratones obesos alimentados con dieta suplementada con SupD a base de aceite de semillas de *P. radiata*.



3.2. Objetivos Específicos.

- o Estandarizar protocolo de identificación de ácidos grasos desde tejidos murinos aislados.
- o Identificar la presencia de ácido pinolénico desde hígado, músculo esquelético, duodeno, tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo, en muestras de tejidos murinos.
- o Comparar el perfil de ácidos grasos desde tejidos aislados de ratones alimentados con suplemento a base de aceite de *P. radiata* respecto a controles sin suplemento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestras de tejido.

Para la realización de esta investigación, se utilizó tejidos aislados previamente desde roedores obesos suplementados con aceite de *Pinus radiata*, en el marco del proyecto FONDEF D11i1067 “Obtención de un extracto lipídico con actividad inhibidora del apetito a partir de semillas de gimnospermas introducidas”. Estos tejidos fueron almacenados a una temperatura de -80 °C para su conservación. Brevemente, 35 ratones hembra de la cepa C57BL/6 fueron alimentados con una dieta HFD durante 4 meses. Luego se subdividieron en 5 grupos, manteniendo la dieta alta en grasas la que se suplementó con 15% p/p aceite de *Glycine max* (soja), 15% p/p Pinnothin®, 15% p/p aceite de semilla de *P. radiata*, y 15% p/p SupD, producto a base de aceite de semilla de *P. radiata* (Figura 5).

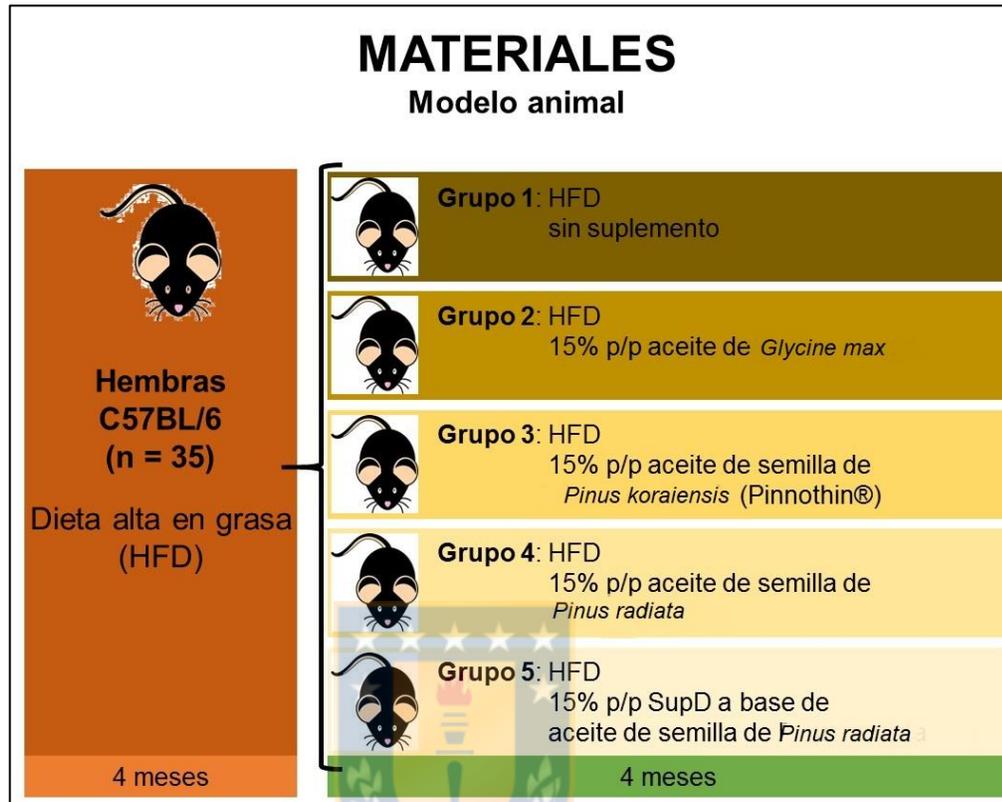


Figura 5. Diseño experimental *in vivo*.

Descripción de los grupos de ratones hembra C57BL/6 respecto a su suplementación durante los 8 meses sometidos a una dieta alta en grasas (HFD). Fuente: Rojas D, 2018.

4.2. Selección de muestras y grupos a analizar.

Para realizar la selección de muestras de tejido a analizar, se consideró los siguientes grupos de la Figura 5:

Grupo 2: Consta de tejidos de roedores hembra, de la cepa C57BL/6, alimentadas con HFD suplementada con 15% p/p aceite de *Glycine max*, el cual funciona

como control negativo de este diseño experimental, al poseer un perfil de ácidos grasos similar al aceite de pino, a excepción de la ausencia de ácido pinolénico dentro del pool de ácidos grasos poliinsaturados que lo componen.

Grupo 3: Consta de tejidos de roedores hembra de la cepa C57BL/6, alimentadas con HFD suplementada con 15% p/p Pinnothin™, producto a base de aceite de *Pinus koraiensis*, el cual funciona como control positivo de este diseño experimental, ya que conocemos la presencia del ácido pinolénico dentro del pool de ácidos grasos que componen este nutraceutico.

Grupo 4: Consta de tejidos de roedores hembra de la cepa C57BL/6, alimentadas con HFD suplementada con 15% p/p aceite de semilla de *Pinus radiata* obtenido por prensado en frío.

Grupo 5: Consta de tejidos de roedores hembra de la cepa C57BL/6, alimentadas con HFD suplementada con 15% p/p de “SupD”, fórmula bajo patente N° 3182-2015 (agosto 2019 – Chile), hecho a base de aceite de *Pinus radiata*.

4.3. Extracción de ácidos grasos desde tejidos aislados.

Para realizar esta investigación fue necesario implementar un método para el tratamiento previo de la muestra, con el fin de optimizar la recolección de los ácidos grasos del tejido en cuestión. Se utilizó la técnica de Folch (1957), la cual consiste en un proceso de extracción por solvente de la fase lipídica.

Brevemente, aproximadamente 30 mg de cada uno de los tejidos a analizar se les agregó 500 μL de metanol, seguido de homogenización por 20 segundos aproximadamente, (dependiendo de la dificultad de cada matriz), utilizando homogeneizador Turrax (Tissue Teator, Biospec). A esta suspensión se le adicionó 1000 μL de cloroformo y 200 μL de agua ultrapura, para facilitar la separación de fases. Luego de agitar en vortex por 1 minuto, se removió la fase acuosa y se evaporó el exceso de cloroformo bajo corriente de nitrógeno. Una vez realizado este proceso, las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante la realización de la derivatización en grupos de 5 muestras.

4.3.1. Realización de *batch* control para cada tejido.

El *batch* control para cada tejido se utilizó como un control interno de matriz, con el fin de evaluar reproducibilidad inter-ensayo. Así, por tipo de tejido,

una vez realizada la remoción de la fase acuosa en el proceso de extracción de cada una de las muestras por separado, se aisló una alícuota de 100 μL de fase orgánica de cada una de ellas y se mezclaron, obteniendo un volumen de 2000 μL . Se trasvasijó 500 μL en 3 viales para obtener así 4 *batch* de igual volumen, conservándose a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta utilización. En cada conjunto de análisis se incluyó un *batch* como control.

4.4. Derivatización de ácidos grasos.

Para realizar la derivatización de los ácidos grasos extraídos en el paso anterior, se adicionó a la muestra 800 μL de Metanol/NaOH 0,5 N y se agitó por 30 segundos en vortex. Luego, se incubó a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos en baño maría con el objetivo de catalizar la reacción. Posteriormente, tras dejar enfriar a temperatura ambiente, se adicionó 1000 μL de BF_3 el cual actúa como agente derivatizante, seguido de incubación nuevamente a baño maría por 3 minutos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras este proceso, se dejó enfriar y se añadió 1000 μL de hexano grado p.a, seguido de incubación en baño maría a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, esta vez durante un minuto.

Luego de este procedimiento, tras adicionar 1000 μL de NaCl saturado y una espátula de NaCl sólido, se dejó reposar breves minutos con el fin de lograr una buena separación de fases. Posteriormente, se realizó la separación de

fases trasvasijando la fase orgánica a una pipeta Pasteur de vidrio que contenía Na_2SO_4 (s), funcionando como filtro, con el fin de evitar la posible contaminación con solución acuosa y/o impurezas previo a la inyección en el instrumento. Tras colección del eluido orgánico en un vial, se procedió a realizar una dilución 1:10 v/v de dicha solución, tomando 100 μL de la muestra y diluyéndola con 900 μL de hexano, con el fin de obtener una señal óptima para la lectura de los cromatogramas.

La derivatización de ácidos grasos consta principalmente de una modificación química de un compuesto para producir un derivado de éste, con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis. En este caso particular, se realiza una esterificación de los ácidos grasos gracias a la acción del NaOH metílico 0.5 N, por lo cual se formarían ésteres de ácidos grasos que presentarían una mayor volatilidad y baja polaridad, para su posterior análisis en el equipo de cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (Quehenberger, *et al.* 2011).

4.5. Análisis de tejidos por GC/MS.

Para realizar la identificación del ácido graso de interés en los tejidos, se utilizó un estándar de ácido pinolénico (Cayman Chemicals®), con la finalidad de

obtener el cromatograma con el *peak* del compuesto aislado y así comparar con los *peaks* de los cromatogramas obtenidos de cada una de las muestras analizadas.

Una vez realizada la extracción y posterior derivatización de los ácidos grasos obtenidos de los tejidos en cuestión, se realizó el análisis del perfil de ácidos grasos propiamente tal, utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas, cuyas características son las siguientes:

- 
- Cromatógrafo de gases: Agilent technologies 7890 A
 - Espectrómetro de masa: Agilent technologies 5975C
 - Inyector: Split/Splitless
 - Columna: Agilent 19091S-433 325 °C: 30m x 250 µm x 0,25 µm

4.5.1. Análisis estándar de ácido pinolénico.

Para realizar el análisis del estándar de ácido pinolénico (Cayman Chemicals®) se hizo una dilución del vial original de concentración 50 mg/mL en una solución de etanol. Para lograr un cromatograma con una señal óptima, se realizó una dilución en etanol 1:20.

4.5.2. Secuencia de análisis de muestras.

El análisis se realizó para cada tejido por separado. Para todos los tejidos, se realizó la extracción de ácidos grasos de forma simultánea. Sin embargo, el proceso de derivatización y análisis por Cromatografía gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas, se realizó en 3 secuencias de 5 muestras cada una y una última secuencia de 6 muestras. Fueron seleccionadas de manera aleatoria, asignándoles un número a cada muestra y siendo analizadas en el orden aleatorio que fue arrojado por el programa utilizado.

En cada grupo de muestras, se utilizó un blanco, un estándar, y un *batch* control del tejido, los cuales sirvieron como control para verificar la reproducibilidad del método. Las muestras fueron analizadas en el orden indicado en la Tabla I.

Tabla I. Diseño de análisis de muestras. Orden en el que fueron analizadas las muestras por el Cromatógrafo de gases. Los tejidos fueron analizados en 4 secuencias para completar 21 muestras en total por cada tejido. Cada número corresponde al código identificador de la muestra según tejido.

Secuencia	HIGADO (nº muestra)	M. E. (nº muestra)	T.A.V (nº muestra)	T.A.S.C. (nº muestra)	DUODENO (nº muestra)
1	68	57	19	33	58
	57	40	16	61	31
	35	33	57	58	62
	64	61	60	65	44
	71	71	6	68	23
2	23	60	36	71	40
	36	39	64	60	61
	39	6	33	39	48
	31	35	28	6	71
	61	65	58	62	6
3	62	36	68	16	33
	19	58	39	31	63
	25	68	25	28	35
	16	64	44	36	39
	65	28	23	64	60
4	28	23	65	23	36
	6	60	35	57	68
	33	25	67	63	28
	63	16	62	19	66
	60	19	31	35	67
	58	63	61	25	25

M.E. = Músculo Esquelético; T.A.V. = Tejido Adiposo Visceral; T.A.S.C. = Tejido Adiposo Subcutáneo. Fuente: Elaboración propia.

5. RESULTADOS

5.1. Estandarización del protocolo.

Se utilizó como protocolo de base en cada uno de los tejidos el procedimiento descrito en la sección 4 de Materiales y Métodos. Sin embargo, debido a la distinta naturaleza en los distintos tejidos trabajados, fue necesario realizar ciertas modificaciones en el protocolo original, para optimizar los resultados obtenidos en los cromatogramas.

En particular, en el caso de músculo esquelético, fue necesario realizar una centrifugación a cada muestra luego de terminar el proceso de derivatización, ya que incluso al adicionar NaCl sólido para evitar emulsiones, éstas seguían presentándose, lo cual podría dañar la columna del instrumento al seguir conteniendo fase acuosa.

Por otra parte, también se modificó el protocolo para duodeno, debido a que el perfil de ácidos grasos obtenido en las muestras de prueba tenía una señal muy débil. Para solucionar este inconveniente, las muestras fueron analizadas sin realizar la dilución final 1:10.

5.2. Estándar de ácido pinolénico.

Para la obtención del cromatograma perteneciente al ácido pinolénico puro, se utilizó el estándar del compuesto mencionado, comercializado por Cayman Chemicals®. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, se utilizó una dilución 1:20 del estándar 50 mg/mL con etanol. Luego de realizar esta dilución, la concentración del estándar sería de 2.5 mg/mL.

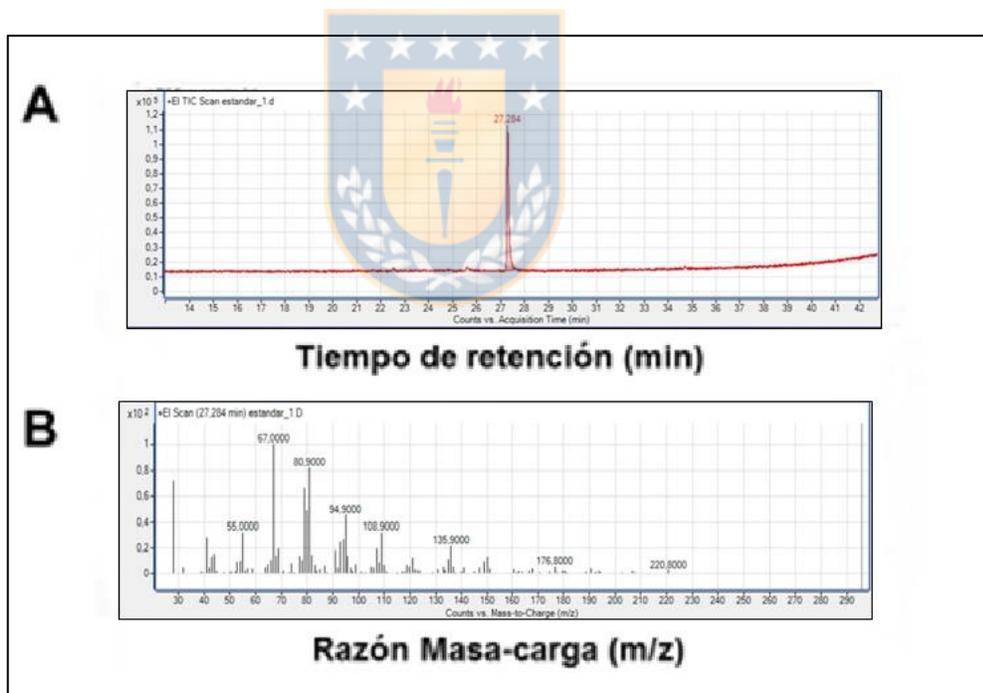


Figura 6. Análisis cromatográfico de ácido pinolénico.

Una dilución 1/20 en etanol de estándar de 50 mg/mL ácido pinolénico fue analizado por GC/MS. A) perfil cromatográfico. B) espectro de masa. Se indica el tiempo de retención del ácido pinolénico de 27.284 min. Fuente: Elaboración propia.

5.3. Análisis de hígado.

Los resultados obtenidos desde el análisis de los cromatogramas pertenecientes al *peak* de ácido pinolénico en el control positivo, son correspondientes al espectro observado en el estándar del compuesto. Para el caso de hígado de los tejidos de roedores tratados en este trabajo, arrojaron resultados donde el perfil de ácidos grasos poliinsaturados se concentra principalmente en el rango de 22 min a 29 min en relación con el tiempo de retención. Se puede observar en las muestras pertenecientes a los roedores tratados con 15% p/p de aceite de pino radiata, y las muestras pertenecientes al grupo de ratones tratados con 15% p/p "SupD", que los espectros correspondientes al *peak* característico del ácido pinolénico en sus respectivos espectros de masa, presenta fragmentos distintos en comparación al estándar.

Por otra parte, se puede observar que el *peak* característico de ácido pinolénico, encontrado en el *batch* de las muestras de hígado, arrojó un espectro de masas donde los fragmentos observados se condicen en su totalidad con el espectro perteneciente al estándar de ácido pinolénico.

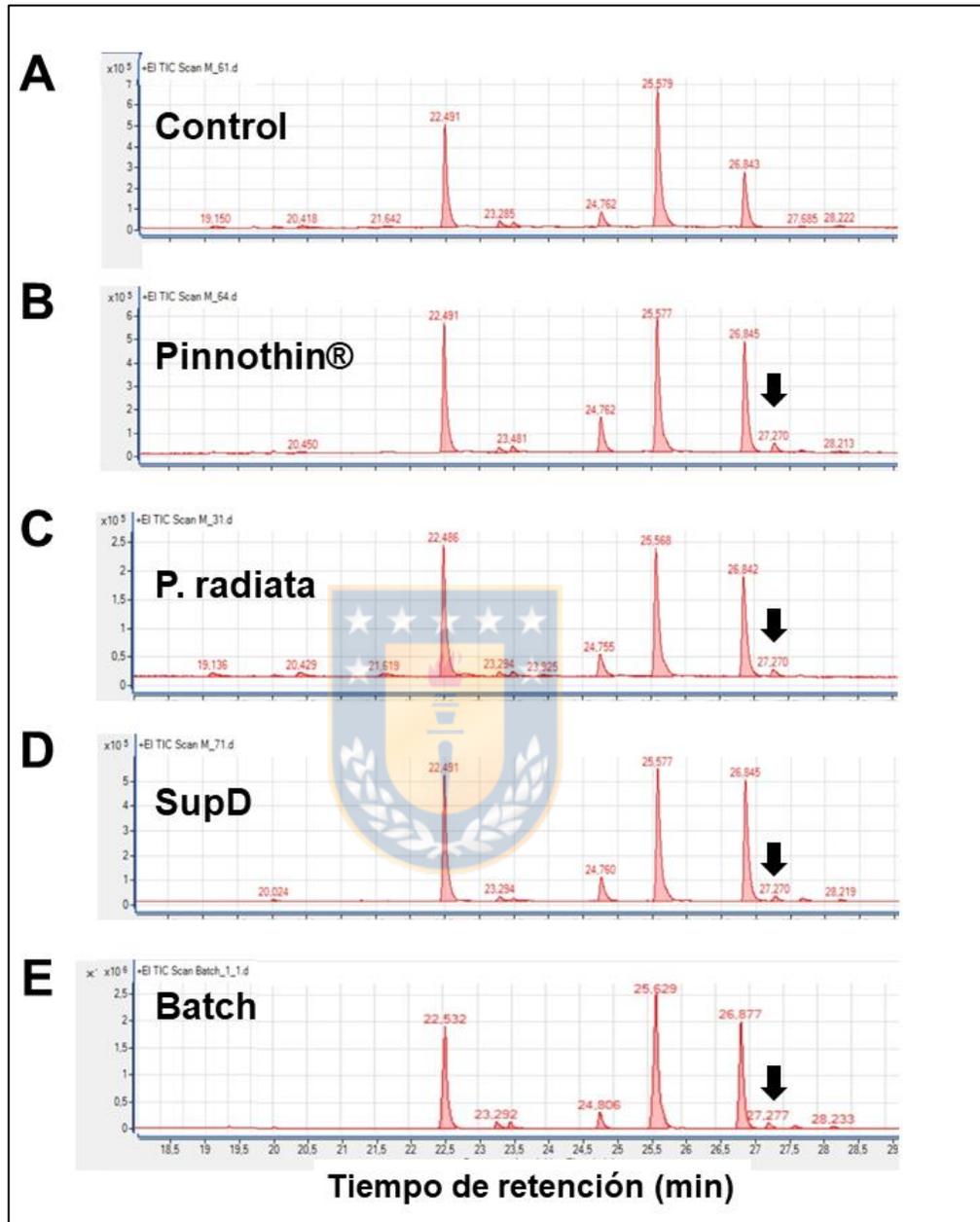


Figura 7. Identificación de ácido pinolénico en tejido hepático.

Cromatogramas representativos del análisis de ácidos grasos desde extracción de muestras de hígado de A) grupo control suplementado con 15% de aceite de soya, B) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, C) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y D) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al *batch* control para tejido hepático. Flecha indica el *peak* coincidente con el tiempo de retención para ácido pinolénico. Fuente: Elaboración propia.

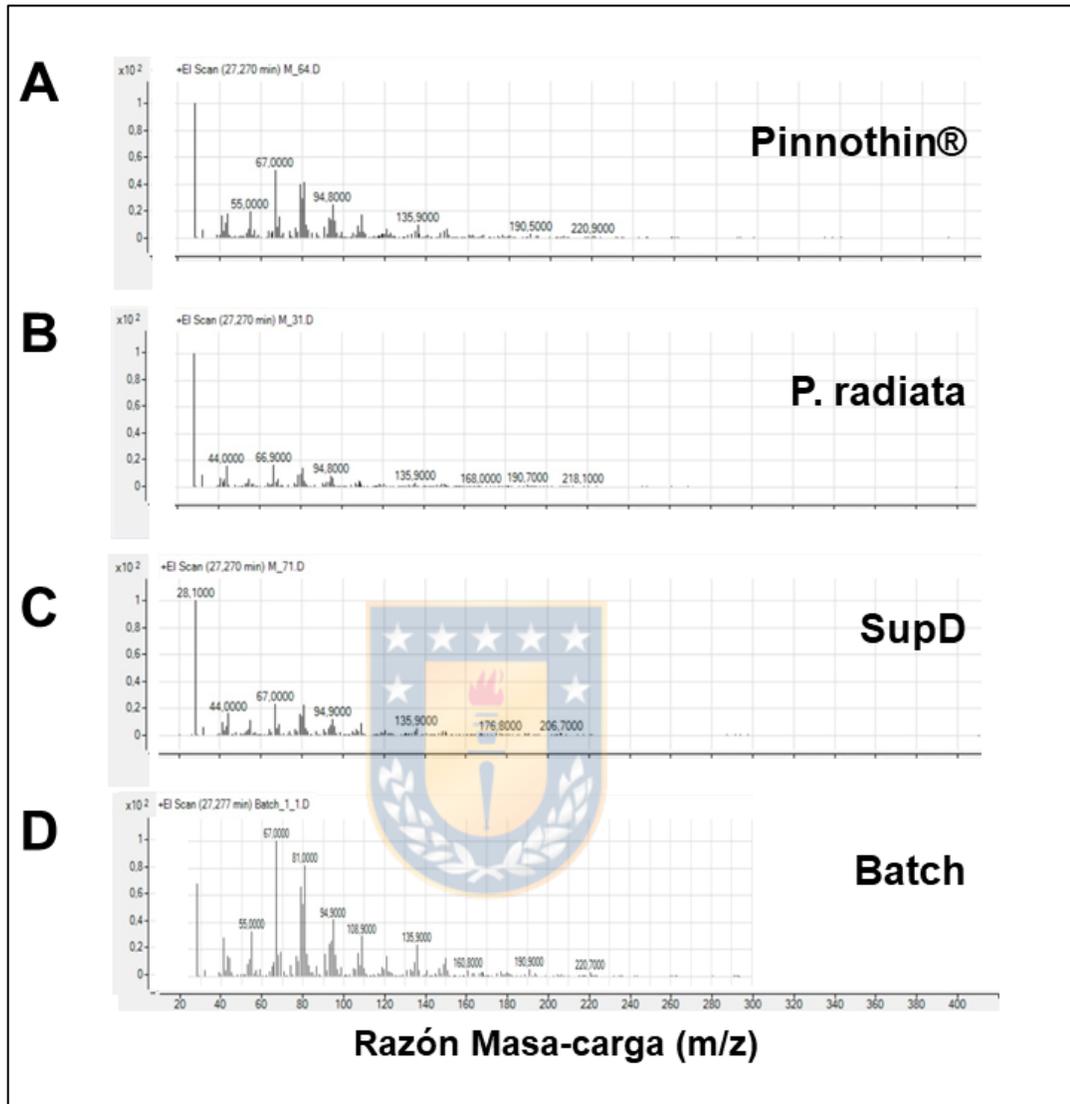


Figura 8. Espectro de masas de *peak* con retención similar a ácido pinolénico en tejido hepático.

Se analizó el espectro de masas del *peak* con tiempo de retención sugerente de ácido pinolénico (~ 27,27 min) desde el análisis de ácidos grasos de muestras de hígado correspondientes A) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, B) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y C) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al espectro de masas para mismo *peak* observado en el *batch* control para tejido hepático. Fuente: Elaboración propia.

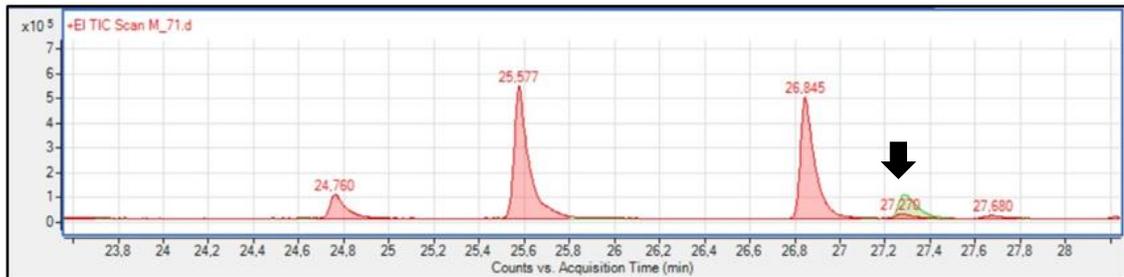


Figura 9. Cromatogramas comparativos en hígado (estándar).

Superposición de los cromatogramas pertenecientes al estándar de ácido pinolénico y una muestra tejido hepático tratado con SupD. Se observa en color verde el *peak* correspondiente al estándar de ácido pinolénico, lo cual sería un indicador de la presencia del compuesto en las muestras de hígado suplementadas con SupD.

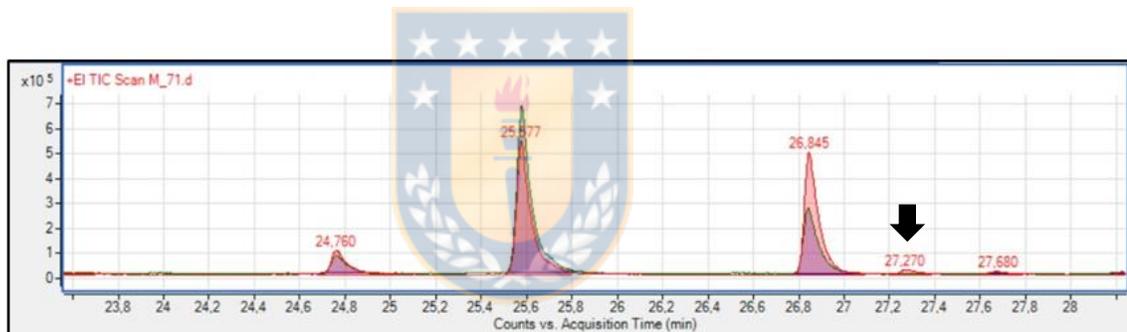


Figura 10. Cromatogramas comparativos en hígado.

Superposición de cromatogramas pertenecientes a muestras de hígado tratadas con aceite de soja (control negativo) y SupD. Se observa en color verde los *peaks* correspondientes la muestra de tejido perteneciente al control negativo. Podemos observar claramente el aumento de las áreas de los *peaks* 26.855 min. y 27.270 min. de la muestra correspondiente a tejido tratado con SupD, evidenciando no solo la presencia del *peak* característico de ácido pinolénico, sino que también el aumento del *peak* anterior.

5.4. Análisis de músculo esquelético.

Los resultados obtenidos de los cromatogramas pertenecientes a músculo esquelético de los tejidos de roedores tratados en este trabajo, arrojaron resultados donde el perfil de ácidos grasos se concentra principalmente en el rango de 22 min a 29 min en relación al tiempo de retención. Si bien los espectros de masa pertenecientes a los *peaks* que sugieren ser de ácido pinolénico en las muestras tratadas no coinciden en su totalidad con el espectro de masas del estándar, presentan claras similitudes. Sin embargo, se realizó un análisis más completo en el apartado 6, discusión.



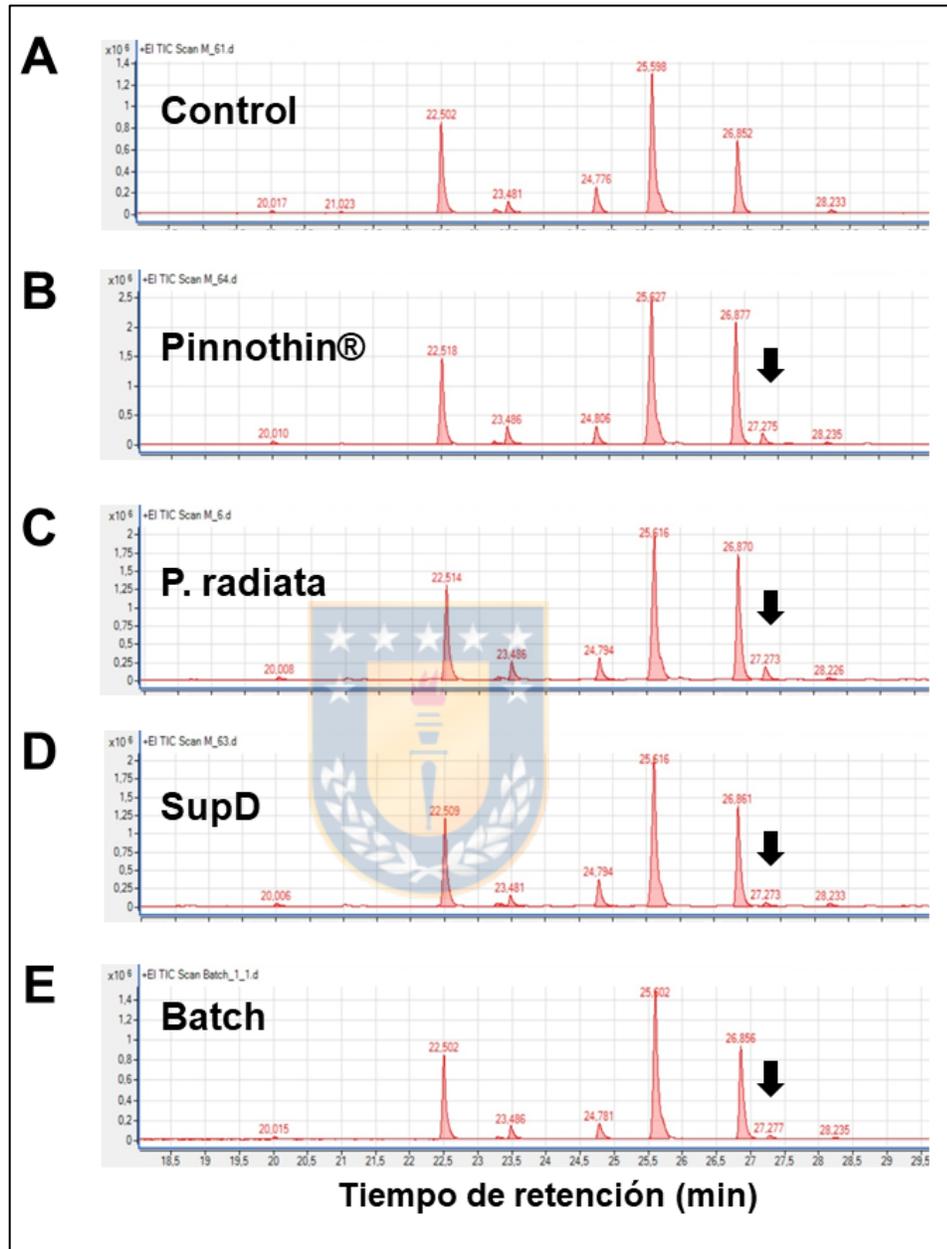


Figura 11. Identificación de ácido pinolénico en tejido muscular esquelético.

Cromatogramas representativos del análisis de ácidos grasos desde extracción de muestras de músculo esquelético de A) grupo control suplementado con 15% de aceite de soja, B) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, C) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y D) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al *batch* control para músculo esquelético. Flecha indica el *peak* coincidente con el tiempo de retención para ácido pinolénico. Fuente: Elaboración propia.

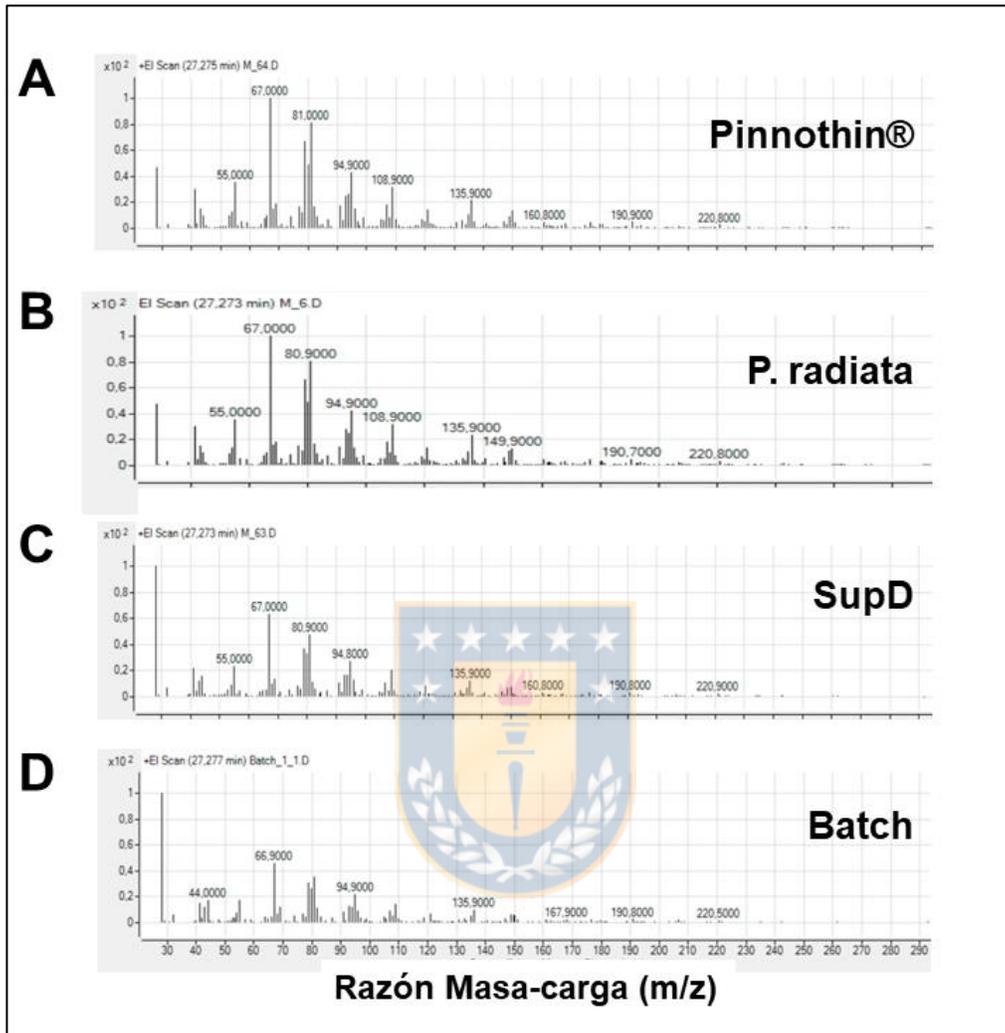


Figura 12. Espectro de masas de *peak* con retención símil a ácido pinolénico en tejido muscular esquelético.

Se analizó el espectro de masas del *peak* con tiempo de retención sugerente de ácido pinolénico (~ 27,27 min) desde el análisis de ácidos grasos de muestras de músculo esquelético correspondientes A) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, B) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y C) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al espectro de masas para mismo *peak* observado en el *batch* control para músculo esquelético. Fuente: Elaboración propia.

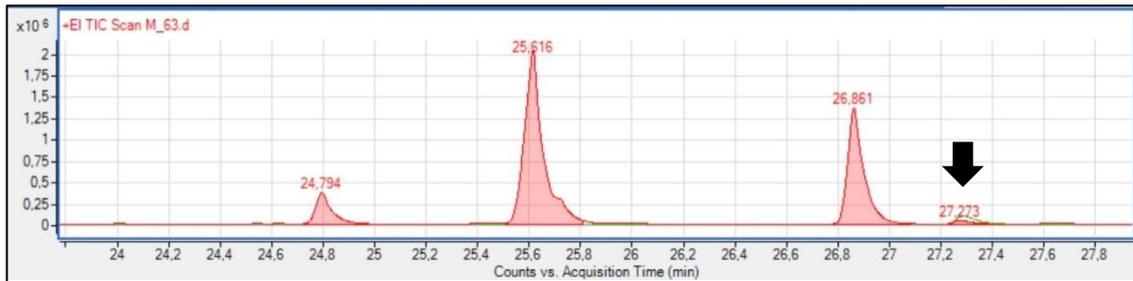


Figura 13. Cromatograma comparativo en músculo esquelético (estándar).

Superposición de los cromatogramas pertenecientes al estándar de ácido pinolénico y una muestra de tejido muscular tratado con SupD. Se observa en color verde el *peak* correspondiente al estándar de ácido pinolénico, lo cual sería un indicador de la presencia del compuesto en las muestras de músculo esquelético suplementadas con SupD.

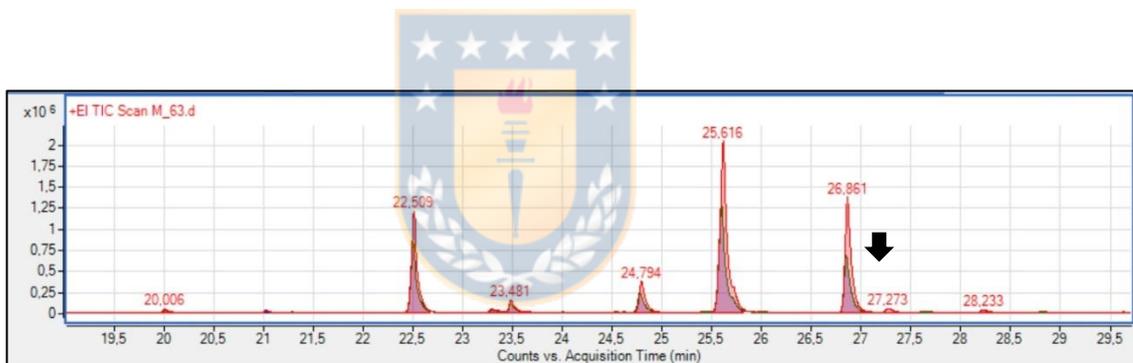


Figura 14. Cromatograma comparativo en músculo esquelético.

Superposición de cromatogramas pertenecientes a muestras de músculo esquelético tratadas con aceite de soja (control negativo) y SupD. Se observa en color azul los *peaks* correspondientes la muestra correspondiente al control. Se puede observar con claridad que todos los *peaks* del rango de PUFA's, han aumentado su señal tras la suplementación con SupD, evidenciando, además, la presencia del *peak* característico de ácido pinolénico.

5.5. Análisis de tejido adiposo visceral.

La lectura de los cromatogramas pertenecientes a tejido adiposo visceral de los ratones de los 4 grupos a analizar de la cepa C57BL/6, nos indica la presencia del *peak* característico del compuesto ácido pinolénico, en la composición de ácidos grasos de este tejido. Se puede observar el *peak* correspondiente al compuesto de interés en cada uno de los cromatogramas de los grupos tratados (a excepción del control negativo), alrededor del tiempo de retención 27 min. Estos *peaks* varían en área, resultando mayores en el control positivo y los tejidos tratados con 15% p/p de aceite de pino radiata, en comparación al *peak* mucho más pequeño que se observa en el cromatograma de la muestra del grupo 5, las cuales fueron suplementadas con SupD.

La comparación entre los espectros de masa de los tejidos de estudio con el espectro de masa del estándar de PLA es coincidente.

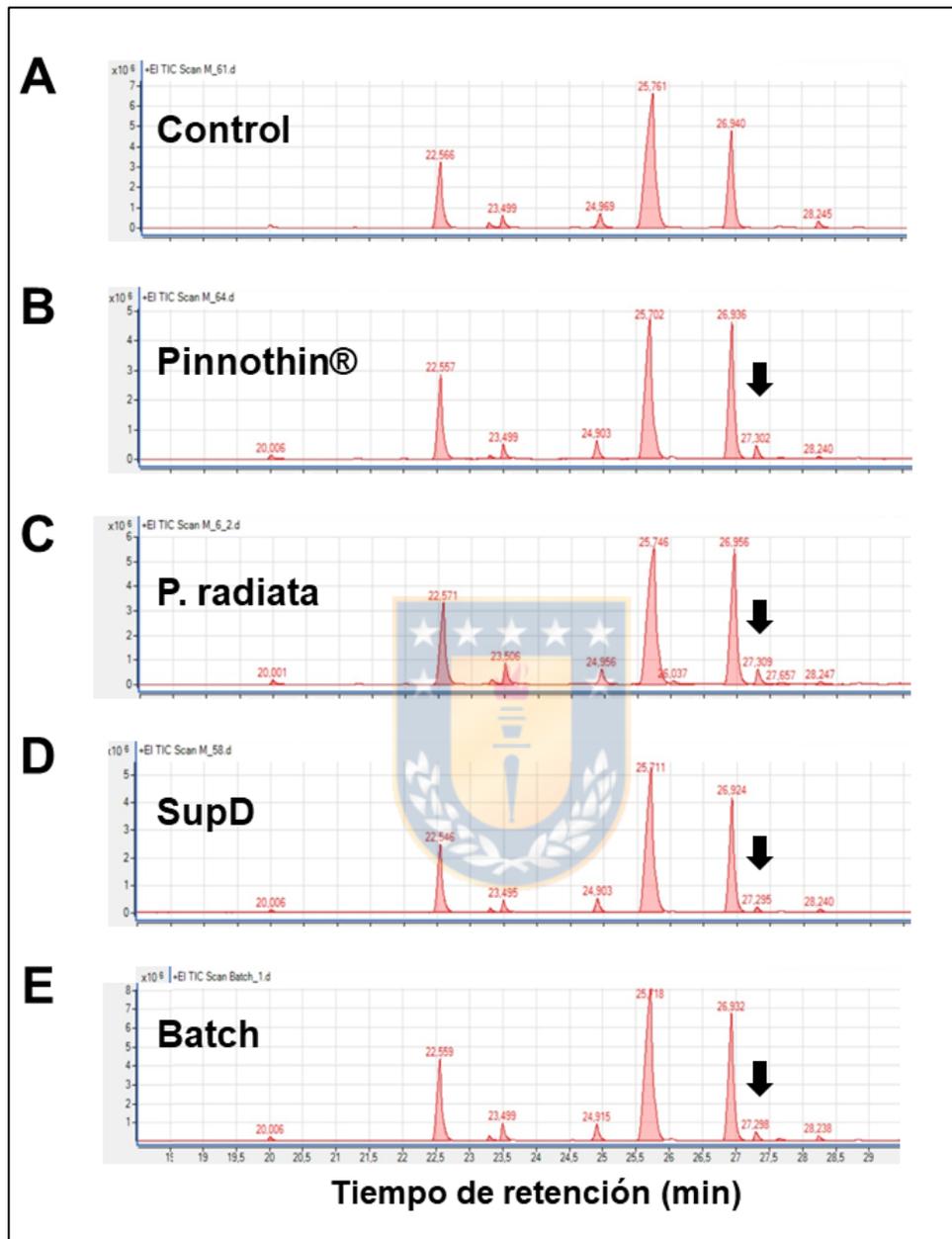


Figura 15. Identificación de ácido pinolénico en tejido adiposo visceral.

Cromatogramas representativos del análisis de ácidos grasos desde extracción de muestras de tejido adiposo visceral de A) grupo control suplementado con 15% de aceite de soya, B) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, C) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y D) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al *batch* control para tejido adiposo visceral. Flecha indica el *peak* coincidente con el tiempo de retención para ácido pinolénico. Fuente: Elaboración propia.

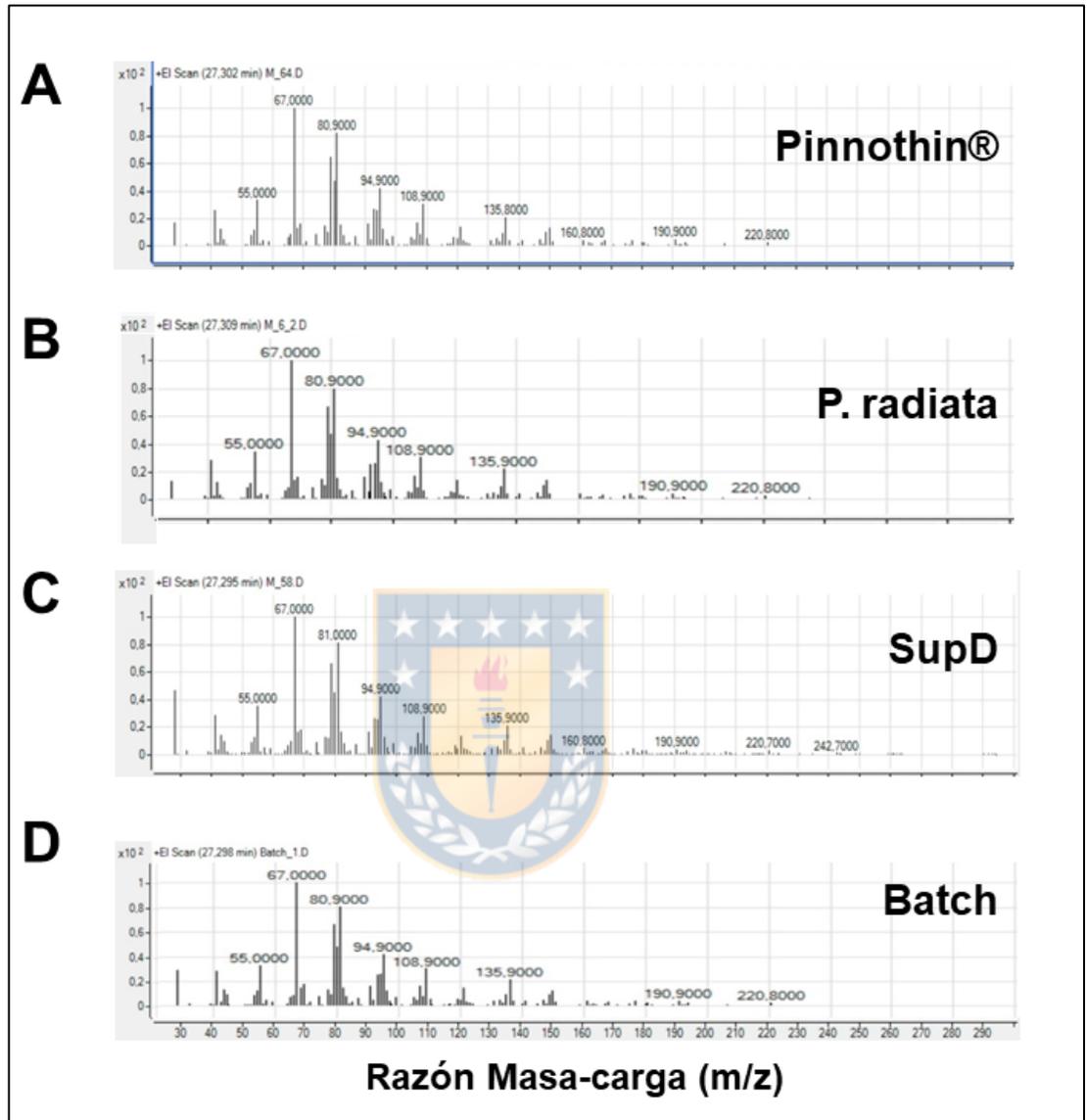


Figura 16. Espectro de masas de *peak* con retención símil a ácido pinolénico en tejido adiposo visceral.

Se analizó el espectro de masas del *peak* con tiempo de retención sugerente de ácido pinolénico (~ 27,29 min) desde el análisis de ácidos grasos de muestras de tejido adiposo visceral correspondientes A) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, B) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y C) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al espectro de masas para mismo *peak* observado en el *batch* control para tejido adiposo visceral. Fuente: Elaboración propia.

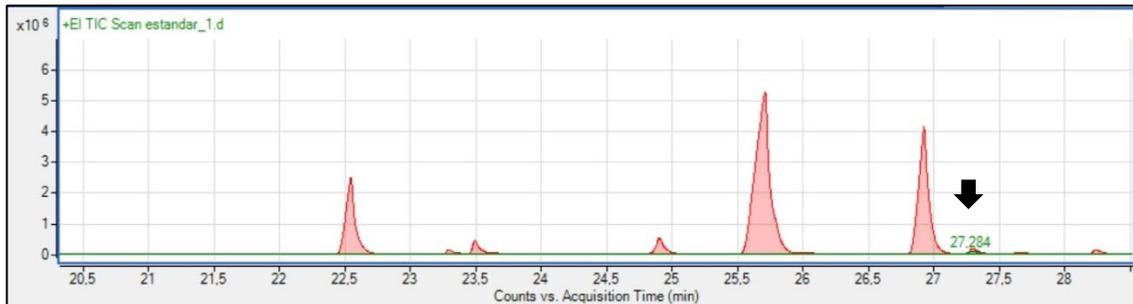


Figura 17. Cromatograma comparativo en tejido adiposo visceral (estándar).

Superposición de los cromatogramas pertenecientes al estándar de ácido pinolénico y una muestra tejido adiposo visceral tratado con SupD. Se observa en color verde el *peak* correspondiente al estándar de ácido pinolénico, lo cual sería un indicador de la presencia del compuesto en las muestras de tejido adiposo visceral suplementadas con SupD.

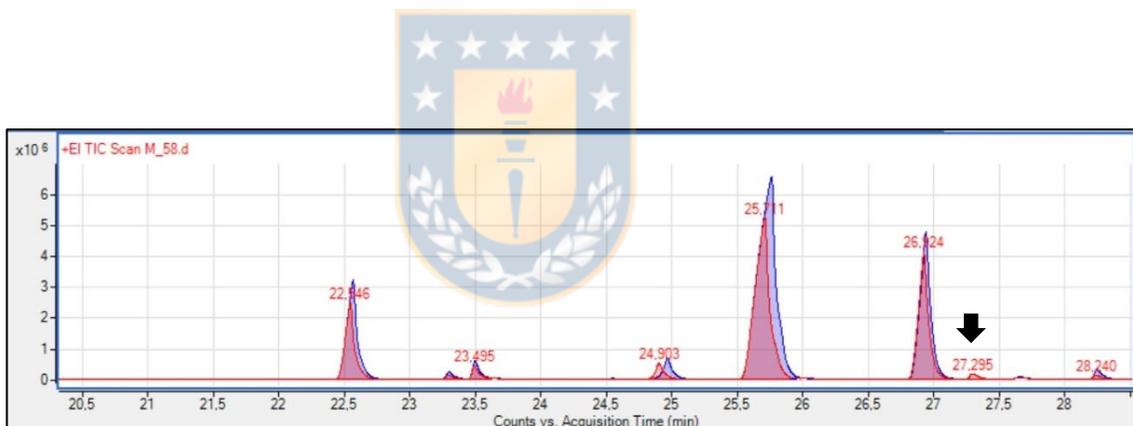


Figura 18. Cromatograma comparativo en tejido adiposo visceral.

Superposición de cromatogramas pertenecientes a muestras de tejido adiposo visceral tratadas con aceite de soya (control negativo) y SupD. Se observa en color azul los *peaks* correspondientes a la muestra control. Se puede observar con claridad que todos los *peaks* del rango de PUFA's, han disminuido su señal tras la suplementación con SupD, evidenciando, además, la presencia del *peak* característico de ácido pinolénico en el tiempo de retención 27.295 minutos. Es el único caso de todos los tejidos analizados, donde se ve la aparición del *peak* característico de PLA, y simultáneamente se observa una disminución significativa de las señales de los otros ácidos grasos.

5.6. Análisis de tejido adiposo subcutáneo.

Los resultados obtenidos de los cromatogramas pertenecientes a tejido adiposo subcutáneo de los tejidos de roedores tratados en este trabajo, arrojaron resultados donde el perfil de ácidos grasos poliinsaturados se concentra principalmente en el rango de 22 - 29 minutos con relación al tiempo de retención. Podemos observar el *peak* característico de ácido pinolénico en todos los cromatogramas (a excepción del control negativo) alrededor del tiempo de retención 27 min. Se observa una señal más alta en los cromatogramas pertenecientes al control positivo (15% p/p Pinnothin®) y 15% p/p aceite de pino radiata.



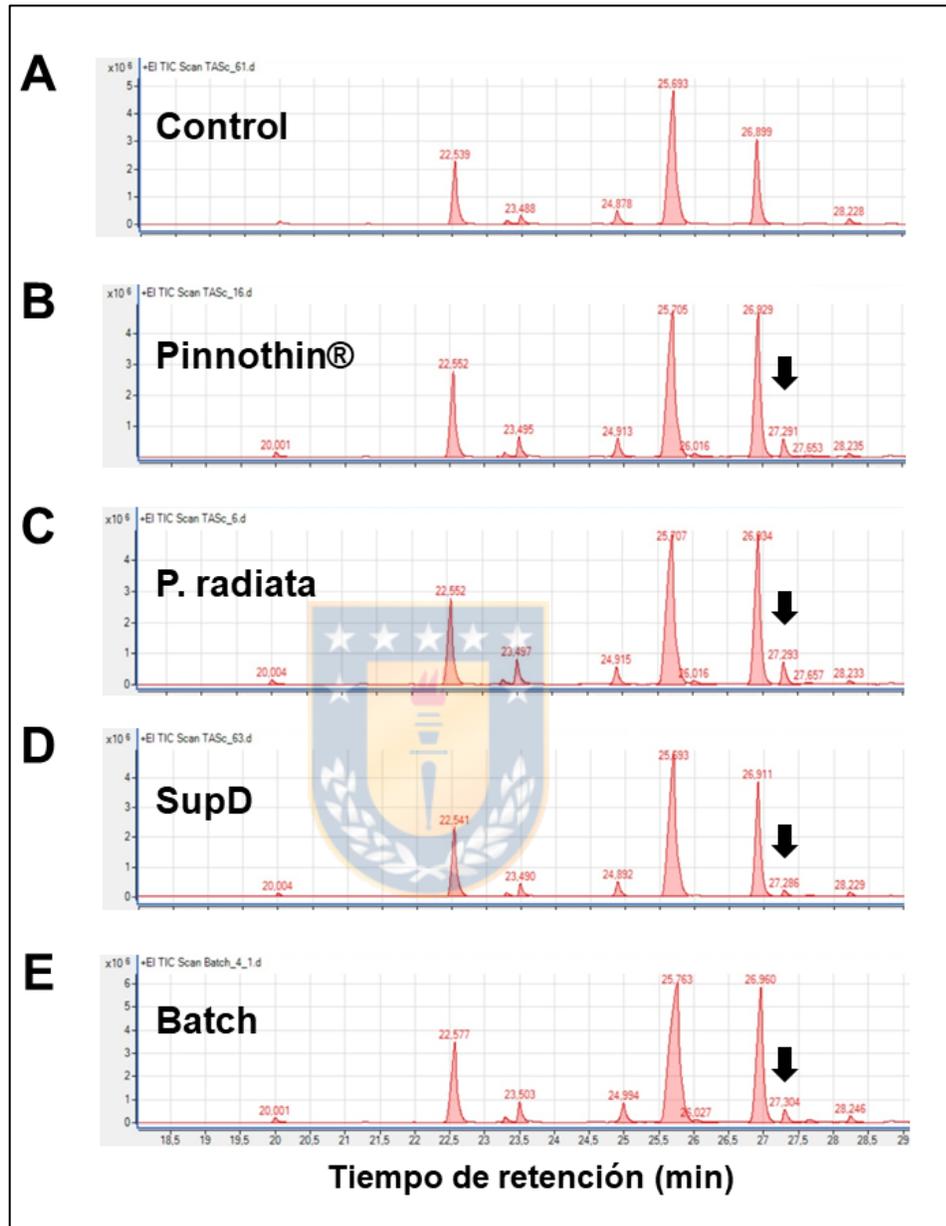


Figura 19. Identificación de ácido pinolénico en tejido adiposo subcutáneo. Cromatogramas representativos del análisis de ácidos grasos desde extracción de muestras de tejido adiposo subcutáneo de A) grupo control suplementado con 15% de aceite de soya, B) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, C) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y D) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al *batch* control para tejido adiposo subcutáneo. Flecha indica el *peak* coincidente con el tiempo de retención para ácido pinolénico. Fuente: Elaboración propia.

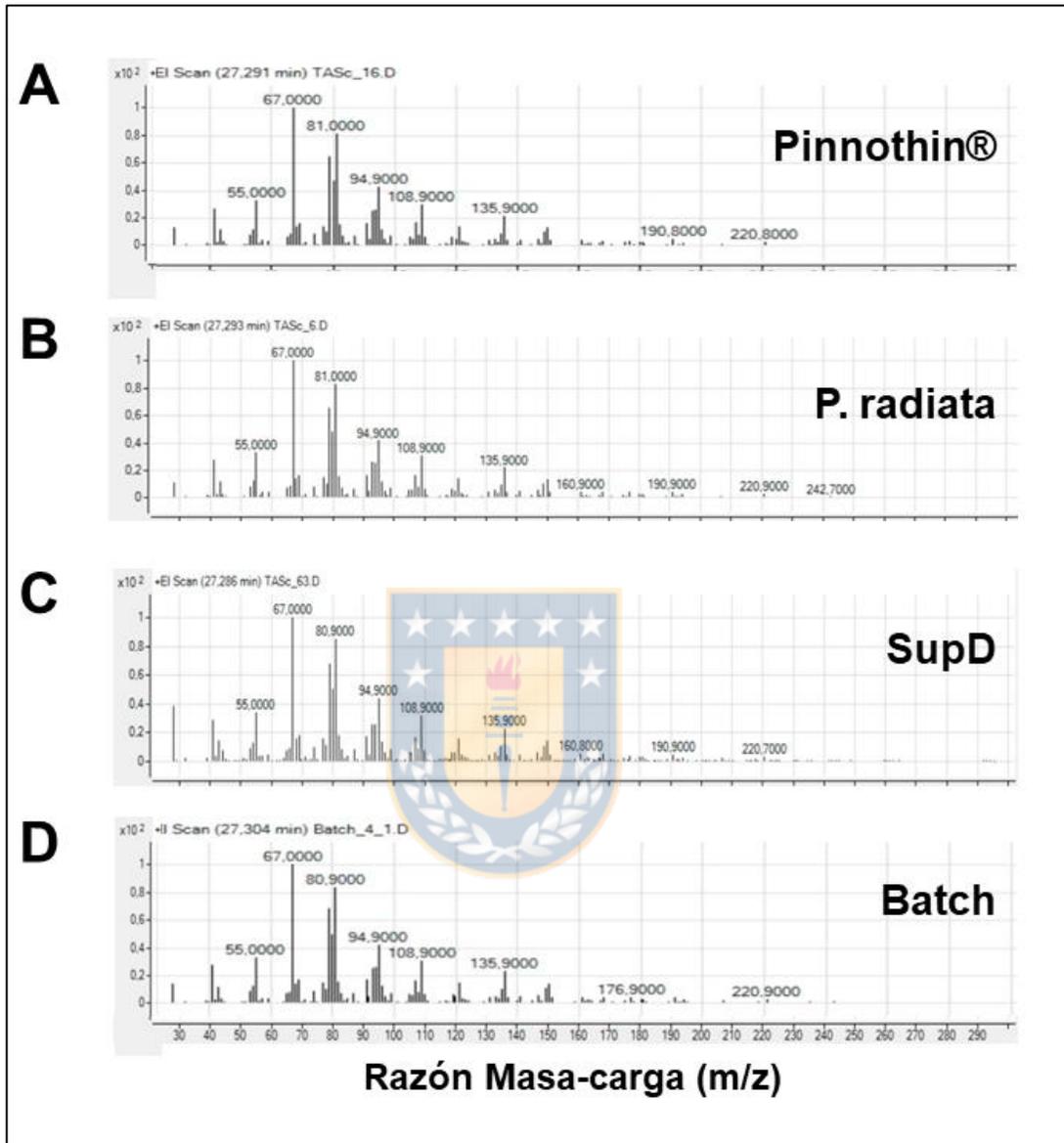


Figura 20. Espectro de masas de *peak* con retención símil a ácido pinolénico en tejido adiposo subcutáneo.

Se analizó el espectro de masas del *peak* con tiempo de retención sugerente de ácido pinolénico (~ 27,29 min) desde el análisis de ácidos grasos de muestras de tejido adiposo subcutáneo correspondientes A) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, B) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y C) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al espectro de masas para mismo *peak* observado en el *batch* control para tejido adiposo subcutáneo. Fuente: Elaboración propia.

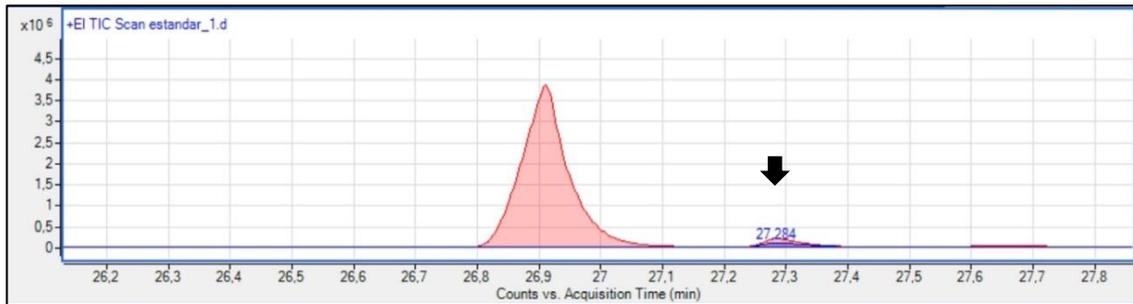


Figura 21. Cromatograma comparativo en tejido adiposo subcutáneo (estándar).

Superposición de los cromatogramas pertenecientes al estándar de ácido pinolénico y una muestra tejido adiposo subcutáneo cuyo tejido fue tratado con SupD. Se observa en color azul el *peak* correspondiente al estándar de ácido pinolénico. En este caso, se integró el cromatograma del estándar de ácido pinolénico, y se aumentó el tamaño de la imagen para lograr una mayor claridad al observar, ya que ambos *peaks* poseen una señal similar, y en la escala utilizada era difícil de distinguir. Esta comparación sugiere que ácido pinolénico también se identifica en tejido adiposo subcutáneo suplementado con SupD.

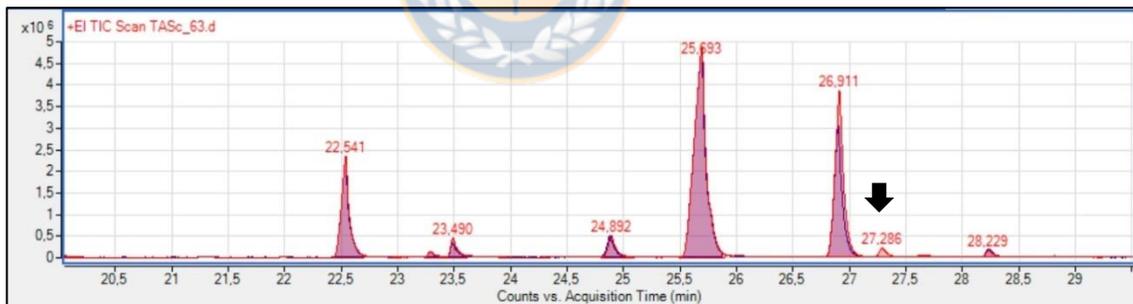


Figura 22. Cromatograma comparativo en tejido adiposo subcutáneo.

Superposición de cromatogramas pertenecientes a muestras de tejido adiposo subcutáneo tratadas con aceite de soja (control negativo) y SupD. Se observa en color azul los *peaks* correspondientes la muestra control. Se puede observar que todos los *peaks* del rango de PUFA's, han aumentado levemente su señal tras la suplementación con SupD, evidenciando, además, la presencia del *peak* característico de ácido pinolénico en el tiempo de retención 27.286 minutos.

5.7. Análisis de duodeno.

Los resultados pertenecientes a los cromatogramas de los tejidos aislados de duodeno presentan un *peak* alrededor del tiempo de retención 30 minutos, que no se ha observado en las demás matrices. Alrededor del tiempo de retención 25 minutos, presenta dos señales unidas, con una baja resolución. Sin embargo, el *peak* de interés que caracteriza al ácido pinolénico se encuentra alrededor del minuto 27, por lo cual no presentaría un problema para su identificación. Se puede observar el *peak* característico de PLA en todos los grupos estudiados, a excepción de los tejidos tratados con aceite de *Glycine max* (control negativo). Es importante resaltar, que, si bien los espectros de masa de los *peaks* característicos de PLA no se coinciden con los fragmentos pertenecientes al espectro del estándar, presentan similitudes.

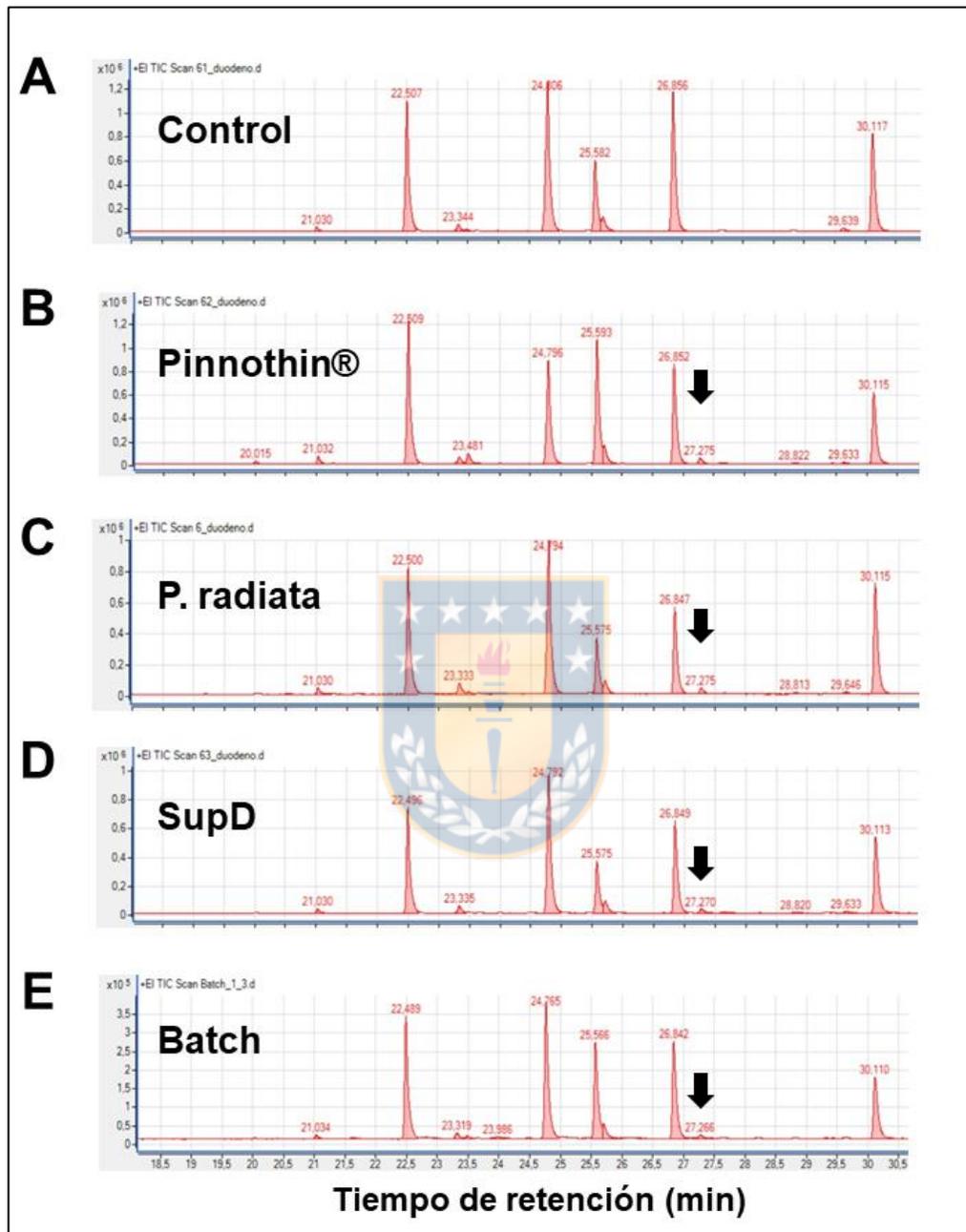


Figura 23. Identificación de ácido pinolénico en duodeno.

Cromatogramas representativos del análisis de ácidos grasos desde extracción de muestras de duodeno de A) grupo control suplementado con 15% de aceite de soya, B) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, C) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y D) grupo suplementado con 15% de SupD. E) corresponde al *batch* control para duodeno. Flecha indica el *peak* coincidente con el tiempo de retención para ácido pinolénico. Fuente: Elaboración propia.

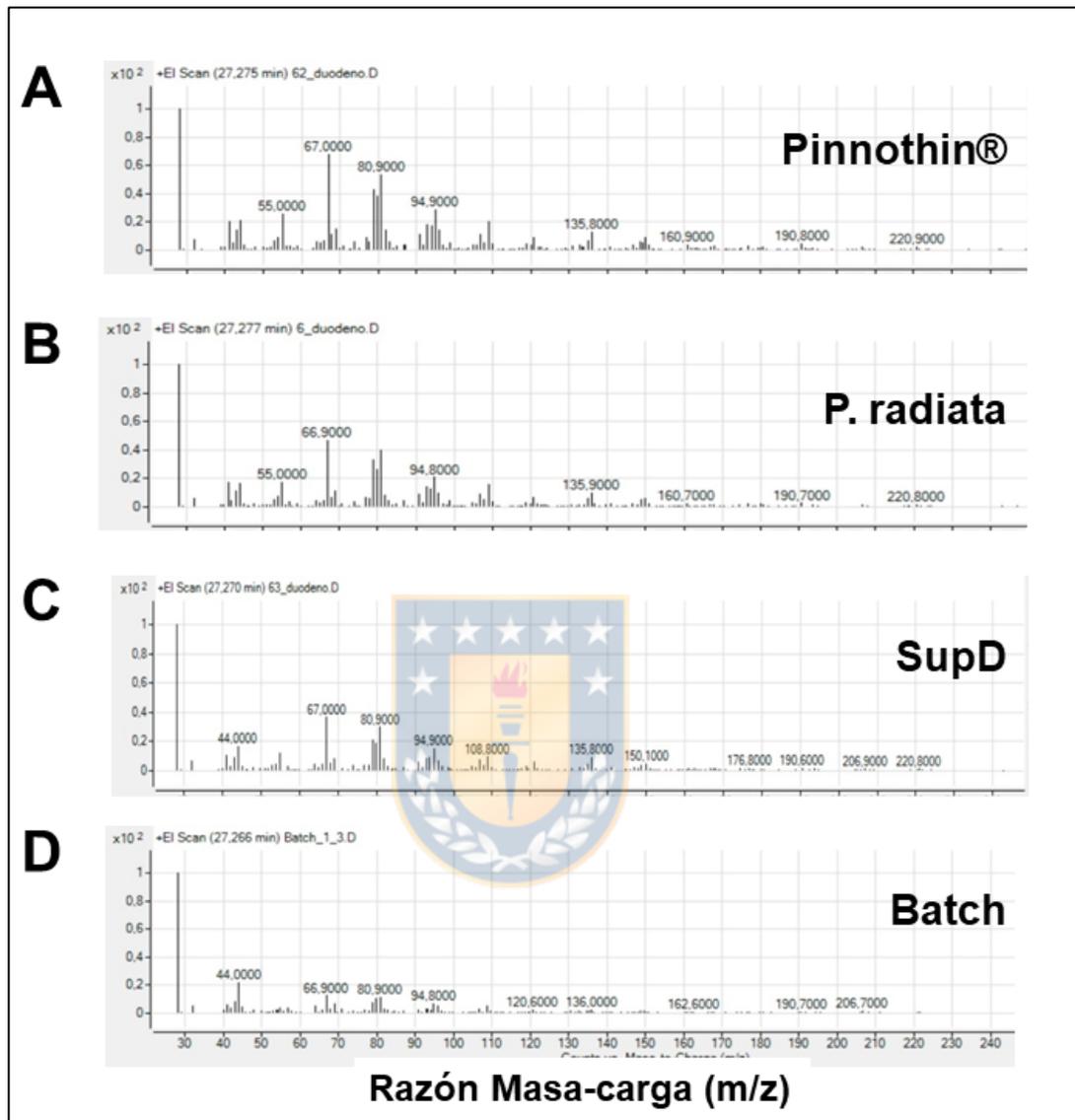


Figura 24. Espectro de masas de *peak* con retención símil a ácido pinolénico en duodeno.

Se analizó el espectro de masas del *peak* con tiempo de retención sugerente de ácido pinolénico (~ 27,27 min) desde el análisis de ácidos grasos de muestras de duodeno correspondientes A) grupo suplementado con 15% Pinnothin®, B) grupo tratado con 15% aceite de *P. radiata* y C) grupo suplementado con 15% de SupD. D) corresponde al espectro de masas para el mismo *peak* observado en el *batch* control para duodeno. Fuente: Elaboración propia.

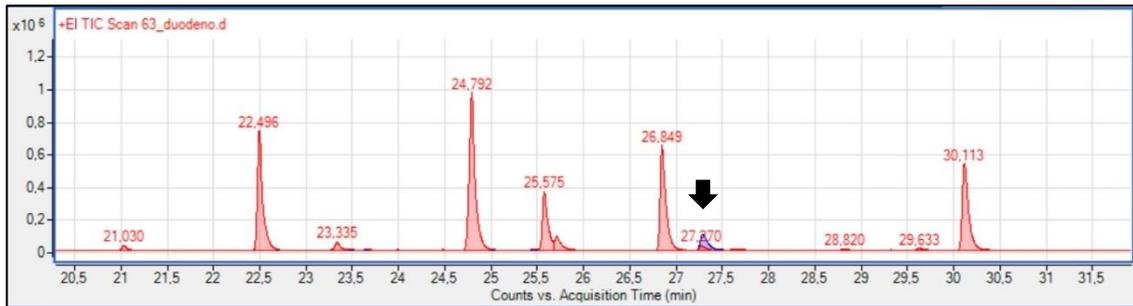


Figura 25. Cromatograma comparativo en duodeno (estándar).

Superposición de los cromatogramas pertenecientes al estándar de ácido pinolénico y una muestra de duodeno cuyo tejido fue tratado con SupD. Se observa en color azul el *peak* correspondiente al estándar de ácido pinolénico. En el tiempo de retención 27.270 min se encuentra el *peak* característico de ácido pinolénico en duodeno, que se superpone en el mismo lugar que el *peak* del estándar. Esta comparación sugiere que ácido pinolénico también se identifica en duodeno suplementado con SupD.

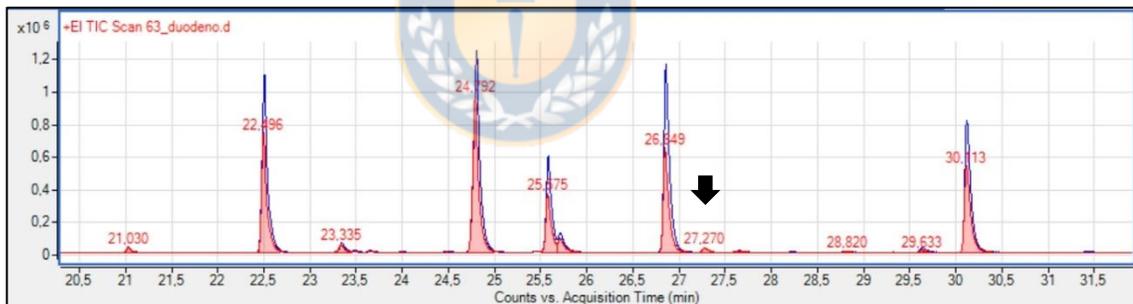


Figura 26. Cromatograma comparativo en duodeno.

Superposición de cromatogramas pertenecientes a muestras de duodeno tratadas con aceite de soya (control negativo) y SupD. Se observa en color azul los *peaks* correspondientes a la muestra control. Se puede observar que todos los *peaks* del rango de PUFA's, han disminuido notoriamente su señal tras la suplementación con SupD, evidenciando, además, la presencia del *peak* característico de ácido pinolénico en el tiempo de retención 27.270 minutos.

6. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado las bondades del consumo de aceite de semillas de pino, en particular por sus efectos en obesidad. Si bien se ha sugerido que el ácido pinolénico (PLA) sería el componente bioactivo de este aceite responsable de dichos efectos, no se ha demostrado a la fecha que éste se distribuya a nivel sistémico ni que alcance compartimentos tisulares *in vivo*. El presente trabajo logró demostrar por primera vez que PLA forma parte del pool de ácidos grasos en tejidos aislados desde animales que consumen “SupD”, suplemento patentado a base de aceite de *P. radiata*. Estos resultados evidencian que PLA logra ser absorbido a nivel intestinal, distribuido en el organismo e incorporado en diferentes tejidos. Estos antecedentes aportan a la comprensión de los mecanismos asociados a los efectos benéficos del consumo de aceite de semillas de pino en obesidad.

Tras analizar los resultados de los perfiles de ácidos grasos obtenidos, ya sea de los mismos grupos de tejidos o entre tejidos diferentes, se observó diferencias de la abundancia relativa de cada uno de los compuestos. El hecho de realizar el análisis del compuesto PLA dentro de una matriz biológica como son los tejidos murinos, en mezcla con otros PUFA's y utilizando el instrumento de análisis en modo SCAN (para el caso del presente trabajo consistente en

hacer barridos entre dos masas, para obtener una información total del contenido de la muestra a analizar), podrían ser una de las razones de que existan estas alteraciones en la abundancia relativa. Cabe mencionar que la señal del *peak* de PLA en los cromatogramas estaba muy baja y podría verse afectada por el ruido base del instrumento. Esto requiere mayor análisis si se pretende posteriormente analizar parámetros cuantitativos de estos analitos.

En cuanto al análisis del espectro de masas, es importante resaltar el ión característico en los fragmentos $m/z = 150$ para la familia $n=6$ de ácidos grasos, además del pequeño ion $m/z = 141$, que probablemente pertenece al fragmento correspondiente del extremo carboxilo de la molécula (Dobson, *et al.* 2002). Estos iones están presentes tanto en el estándar como en los espectros de los tejidos tratados en este trabajo.

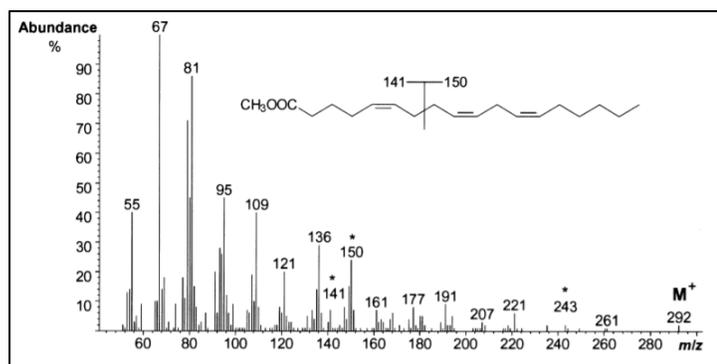


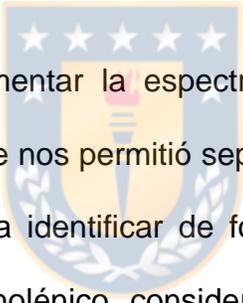
Figura 27. Espectro de masas de ácido (5Z, 9Z, 12Z) -octadeca-5,9,12-trienoico. Patrón de fragmentación de ácido pinolénico utilizado en investigación sobre identificación de ácidos grasos poliinsaturados por espectrometría de masas. Fuente: Dobson *et al.*, 2002.

En términos estructurales, el ácido pinolénico es isómero posicional del ácido gamma-linoleico, el cual es un ácido graso esencial. Su variación radica en el doble enlace presente en el carbono 6 en vez del carbono 5. Esta pequeña diferencia estructural le otorgaría las propiedades sobre el metabolismo lipídico que se conocen (Baker, *et al.* 2020).

Si bien los resultados de esta investigación sugieren la acción directa del compuesto en los tejidos, no podemos descartar en su totalidad una isomerización de este ácido, lo cual también podría ser un factor influyente en los distintos fragmentos observados en los espectros de masa. Por lo tanto, las causas de que el espectro de masas del estándar de ácido pinolénico no sea coincidente en su totalidad con los espectros de los tejidos tratados podría ser multifactorial, teniendo en cuenta las consideraciones comentadas recientemente.

A raíz de los factores comentados anteriormente, surge la duda si el método utilizado y las técnicas empleadas para llevar a cabo el experimento fueron las adecuadas. Se eligió la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas debido a que este tipo de cromatografía se utiliza por defecto para el análisis de ácidos grasos, por sobre cromatografía líquida o cromatografía en capa fina, las cuales suelen presentar complicaciones en base a la oxidación de ácidos grasos y su incompleta recuperación (Quehenberger, *et*

al. 2011). En cuanto a HPLC, presenta características adecuadas para el análisis de estas matrices, sin embargo, suele utilizarse para análisis de muestras menos comunes, por ejemplo, que contengan grupos funcionales degradables al calor. En cuanto a la metodología de extracción, Folch es el método de extracción de ácidos grasos más conocido el cual, según literatura, es el más fiable para la extracción cuantitativa de lípidos (Liu, *et al.* 2018), además de ser el método recomendado por el laboratorio donde se realizó la investigación, debido a la experiencia y alcance de materiales disponibles.



El hecho de implementar la espectrometría de masas seguido de la cromatografía de gases que nos permitió separar los distintos compuestos de la matriz nos ha servido para identificar de forma comparativa los patrones de fragmentación del ácido pinolénico, considerando que la sensibilidad requerida para este tipo de análisis es compleja, y esta técnica se presentaba como óptima por sobre otras como por ejemplo FID.

Se pudo observar en los cromatogramas de las muestras de tejido adiposo visceral tratadas con SupD, que la señal de los *peaks* pertenecientes al rango de PUFA's, disminuye notoriamente en comparación al control negativo (tejidos suplementados con 15% p/p aceite de *Glycine max*), lo cual se podría relacionar con la investigación realizada por Rojas D. (2018), en la que se indica el efecto

positivo en la disminución de ganancia en peso de roedores HFD suplementados con SupD.

Estos resultados sugieren que los beneficios asociados a la acción metabólica que tiene el ácido pinolénico sobre el organismo, analizado en los estudios anteriores mencionados, estaría relacionado a su acción directa con el tejido en cuestión, ya que lograría llegar al sitio de acción y formar parte del pool de ácidos grasos que lo componen.

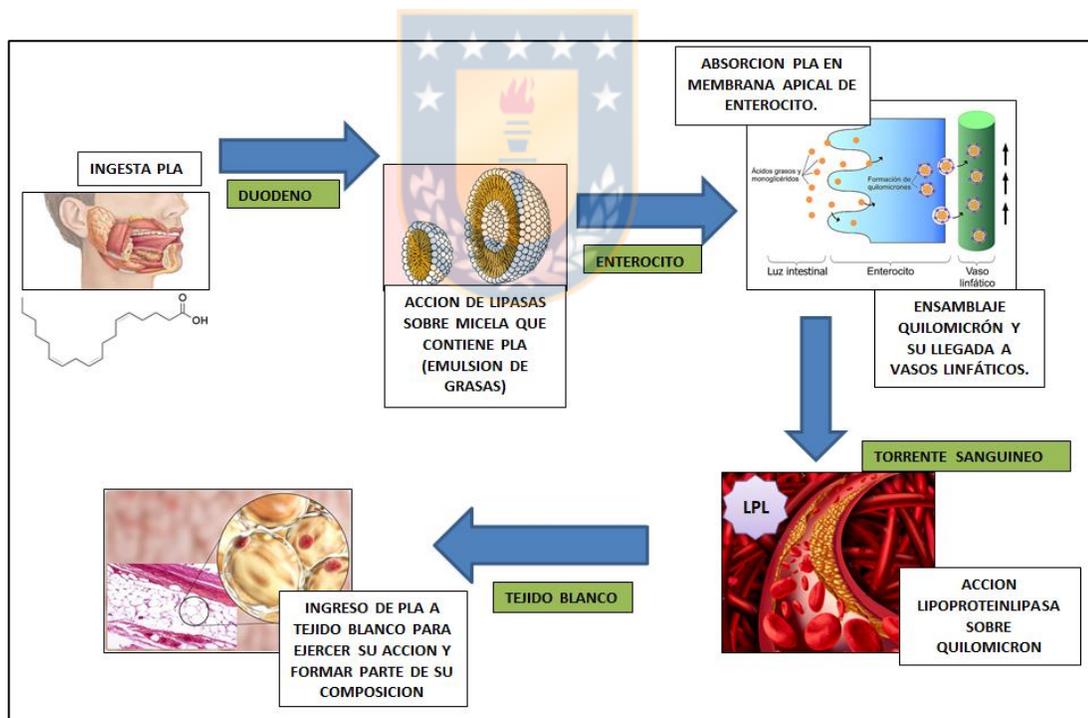


Figura 28. Modelo preliminar de distribución de ácido pinolénico en el organismo.

Esquema que muestra la distribución de PLA en el organismo, basado en la evidencia científica analizada en este trabajo, sumado a los resultados obtenidos que sugieren su llegada al tejido blanco para ejercer su acción beneficiosa sobre el metabolismo de lípidos. Fuente: Elaboración propia.

7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

En este trabajo se logró identificar por primera vez el enriquecimiento *in vivo* de tejidos mamíferos con ácido pinolénico tras consumo de alimento suplementado con aceite de semillas de *P. radiata*. Como se mencionó previamente, todos los estudios publicados analizando los efectos de PLA están realizados bajo condiciones *in vitro*, lo cual abre una amplia gama de posibilidades para profundizar en el marco de esta investigación.

Se logró encontrar e identificar el compuesto formando parte de la composición del hígado, músculo esquelético, tejido adiposo visceral, tejido adiposo subcutáneo y duodeno. Se necesita más investigación para saber si el compuesto logra formar parte de la composición de otros órganos de gran relevancia, tales como cerebro, el corazón e incluso otros tejidos grasos como el tejido adiposo pardo.

Si bien la identificación de PLA en los tejidos estudiados en este trabajo ayuda a dilucidar en parte cómo sería el mecanismo de acción de este compuesto sobre el organismo, no nos permite realizar un modelo de biodistribución completo del ácido pinolénico, ya que no estamos hablando de concentraciones. Por ello resultaría interesante poder trabajar a futuro de manera más analítica

estos resultados, realizando una cuantificación del compuesto en los tejidos mencionados, utilizando el estándar (Cayman Chemicals®) para realizar una curva de calibración, y así extrapolar los resultados mediante el método de mínimos cuadrados. Esto era parte inicial de la investigación presente, sin embargo, bajo las condiciones que nos permite la contingencia, fue imposible realizarlo.

A pesar de las preguntas que este trabajo logra responder, se abre una amplia gama de nuevas preguntas que resultan interesantes para seguir con esta área de investigación, ya que no sabemos la acción *in vivo* que tendría este ácido graso sobre receptores nucleares como PPAR, que están directamente relacionados con la regulación del tejido graso en el organismo.

Por otra parte, considerando que este trabajo se realizó sobre un modelo murino de obesidad inducida por dieta con suplementación crónica con aceite de semillas de pino, sería interesante desarrollar un plan de trabajo para evaluar la acción del ácido pinolénico en condiciones agudas. Esto se podría realizar mediante el análisis postprandial del contenido graso de los quilomicrones plasmáticos tras una suplementación aguda de PLA a distintas horas.

8. GLOSARIO

ADP: Adenosin difosfato.

AMP: Adenosin monofosfato.

Batch: Lote de muestras de la misma matriz.

BF3: Trifluoruro de Boro.

CCK: Colecistoquinina.

CD36: *Cluster of Differentiation 36*.

COX2: Ciclooxygenasa 2.

FDA: *Food and Drug Administration*.

FFA1/FFA4: *Free Fatty Acids receptors*.

GC/MS: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

GLP - 1: *Glucagón like peptide 1*.

HFD: *High Fat Diet* (Dieta alta en grasa).

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta eficacia).

IL-1B: Interleucina - 1B.

MINSAL: Ministerio de salud.

NaCl: Cloruro de sodio.

Na₂SO₄: Sulfato de sodio.

PLA: *Pinolenic Acid* (Ácido Pinolénico).

PNO: *Pine Nut Oil* (Aceite de pino).

PPAR: *Peroxisome Proliferator Activated Receptors*.

PUFA: *Poly-Unsaturated Fatty Acids* (Ácidos grasos poliinsaturados).

TAsc: Tejido adiposo subcutáneo.

TAV: Tejido adiposo visceral.

TG: Triglicéridos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Baker, E., Miles, E., & Calder, P. (2020). Gamma-linolenic and pinolenic acids exert anti-inflammatory effects in cultured human endothelial cells through their elongation products. *Proceedings of the Nutrition Society*, 79(OCE2), E366.
2. Biospec.com; Tissue-Tearor; ítem No. 985370-04.
3. Buttet, M., Traynard, V., Tran, T. T. T., Besnard, P., Poirier, H., & Niot, I. (2014). From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: Role of intestinal lipid-binding proteins. *Biochimie*, 96, 37–47.
4. Carrasco, F., Manrique, M., de la Maza, M., Moreno, M., Albala, C., García, J., Díaz, J., & Liberman, C. (2009). Tratamiento farmacológico o quirúrgico del paciente con sobrepeso u obesidad. *Revista médica de Chile*, 137(7), 972-981.
5. Caymanchem.com; Pinolenic Acid; Item No. 10008654.
6. Chen, S.-J., Hsu, C.-P., Li, C.-W., Lu, J.-H., & Chuang, L.-T. (2011). Pinolenic acid inhibits human breast cancer MDA-MB-231 cell metastasis *in vitro*. *Food Chem.*, 126, 1708–1715.
7. Chin, S. H., Kahathuduwa, C. N., & Binks, M. (2016). Physical activity and obesity: what we know and what we need to know. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 17(12), 1226–1244.
8. Christiansen, E., Watterson, K. R., Stocker, C. J., Sokol, E., Jenkins, L., Simon, K., Ulven, T. (2015). Activity of dietary fatty acids on FFA1 and

FFA4 and characterisation of pinolenic acid as a dual FFA1/FFA4 agonist with potential effect against metabolic diseases. *Brit. J. Nutr.*, 113, 1677–1688.

9. Chuang, L.-T., Tsai, P.-J., Lee, C.-L. & Huang, Y.-S. (2009). Uptake and Incorporation of Pinolenic Acid Reduces n-6 Polyunsaturated Fatty Acid and Downstream Prostaglandin Formation in Murine Macrophage. *Lipids* 44, 217–224
10. CONAF (2018). Plantaciones Forestales Efectuadas Durante el Año 2018.
11. Cruzado, M., Cedrón, J.C. (2012) Nutraceuticos, alimentos funcionales y su producción. *Revista de Química PUCP*, 2012, vol. 26, nº 1-2.
12. De Pergola, G., & Silvestris, F. (2013). Obesity as a major risk factor for cancer. *Journal of obesity*, 2013, 291546.
13. Díaz, P.A. (2013). Obtención y caracterización de ácidos grasos con actividad inhibitoria del apetito, provenientes de semillas de *Pinus* spp. Introducidas en Chile. Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Univ. de Concepción.
14. Dobson, G., & Christie, W. W. (2002). Mass spectrometry of fatty acid derivatives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(1), 36–43.
15. Ferramosca, A., Savy, V., Einerhand, A. W. C. & Zara, V. (2008). *Pinus koraiensis* seed oil (PinnoThin™) Supplementation Reduces Body Weight Gain and Lipid Concentration in Liver and Plasma of Mice. *J. Anim. Feed SCI* 621–630.
16. Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509.

17. Frantisek, Z. y Meuselbach, M. D. K (2010). Effect of *Pinus koraiensis* seed oil on satiety hormones CCK and GLP-1 and appetite suppression. *EUSTM*. **1**, 3–6.
18. Hughes, G. M., Boyland, E. J., Williams, N. J., Mennen, L., Scott, C., Kirkham, T. C., Harrold, J. A., Keizer, H. G., & Halford, J. C. (2008). The effect of Korean pine nut oil (PinnoThin) on food intake, feeding behaviour and appetite: a double-blind placebo-controlled trial. *Lipids in health and disease*, **7**, 6.
19. Le, N. H., Shin, S., Tu, T. H., Kim, C.-S., Kang, J.-H., Tsuyoshi, G. (2012). Diet Enriched with Korean Pine Nut Oil Improves Mitochondrial Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle and Brown Adipose Tissue in Diet-Induced Obesity. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11935–11941
20. Liu, Z., Ezernieks, V., Rochfort, S., & Cocks, B. (2018). Comparison of methylation methods for fatty acid analysis of milk fat. *Food Chemistry*, **261**, 210–215.
21. Mandviwala, T., Khalid, U., & Deswal, A. (2016). Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? *Current Atherosclerosis Reports*, **18**(5).
22. Ministerio de Salud, Chile. (2017). Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 Primeros Resultados. *J Obes Overweight*. OMS.
23. Park, S., Lim, Y., Shin, S. & Han, S. N. (2013). Impact of Korean pine nut oil on weight gain and immune responses in high-fat diet-induced obese mice. *Nutr. Res. Pract.* **7**, 352–358.
24. Park, S., Shin, S., Lim, Y., Shin, J., Seong, J., & Han, S. (2016). Korean Pine Nut Oil Attenuated Hepatic Triacylglycerol Accumulation in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, **8**(1), 59.
25. Pasca, A.J., Montero J.C. (2015) El Corazón del Obeso. Buenos Aires (Argentina): Intermedica; 2015.

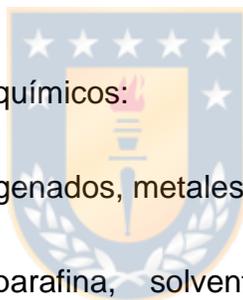
26. Pasman, W. J., Heimerikx, J., Rubingh, C. M., Van Den Berg, R., O'Shea, M., Gambelli, L. (2008). The effect of Korean pine nut oil on *in vitro* CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids Health Dis.* **7**, 1–10.
27. Quehenberger, O., Armando, A. M., & Dennis, E. A. (2011). High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochimica et biophysica acta*, *1811*(11), 648–656.
28. Rojas D. (2018). Identificación de los mecanismos que median la disminución de peso influenciada por una dieta enriquecida con aceite de semilla de *Pinus radiata* en un modelo murino de obesidad inducido por dieta. Tesis de Magister, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, 117 pp.
29. Sharma AM, et al. (2007). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor y and Adipose Tissue - Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *The J of Clinical Endocrinology & Metabolism.* *92.* 386–395
30. Sugano, M., Ikeda, I., Wakamatsu, K., & Oka, T. (1994). Influence of Korean pine (*Pinus koraiensis*)-seed oil containing cis-5,cis-9,cis-12-octadecatrienoic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism, eicosanoid production and blood pressure of rats. *Brit. J. Nutr.* *72*(5), 775–783.
31. Tanaka, T., Morishige, J., Iwawaki, D., Fukuhara, T., Hamamura, N., Hirano, K., Satouchi, K. (2007). Metabolic pathway that produces essential fatty acids from polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acids in animal cells. *FEBS J*, *274*, 2728–2737.
32. Vio, F., (2018). Aumento de la obesidad en Chile y en el mundo. *Rev. Chil. Nutr.*, *45*(1), 6–6.

33. Zhang, M., Yang, X., Zhao, H. T., Dong, A. J., Wang, J., Liu, G. Y., Zhang, H. (2015). A quick method for routine analysis of C18 trans fatty acids in non-hydrogenated edible vegetable oils by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Control*, 57, 293–301.
34. Zhu, S., Park, S., Lim, Y., Shin, S., & Han, S. N. (2016). Korean pine nut oil replacement decreases intestinal lipid uptake while improves hepatic lipid metabolism in mice. *Nutr. Res. Pract.*, 10(5), 477.



10. ANEXO I: PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTOS DE DESECHOS BIOLÓGICOS Y/O QUÍMICOS

Los procedimientos de almacenaje y eliminación de sustancias peligrosas se realizarán en base al “Reglamento de Manejo de Sustancias Peligrosas” de MATPEL establecido en el Decreto U. de C. N° 2014-016; basado en el Decreto Supremo N°148, la NCh 382 y NCh 2120.



1. Se consideran residuos químicos:

- Tóxicos: solventes halogenados, metales pesados, bromuro de etidio, otros.
- Inflamables: aceite, parafina, solventes no halogenados, formalina, acetonitrilo, otros.
- Corrosivos: ácidos y bases, sólidos y líquidos. - Reactivos: peróxidos, sólidos inflamables, oxidantes (cloratos, nitratos).

2. Se consideran residuos biológicos:

- Biológicos y derivados de procedimientos: placenta, restos humanos en general, animales, apósitos, algodones infectados con agentes patógenos, entre otros.

- Residuos cortopunzantes: agujas, navajas, bisturí, entre otros.

3. Flujograma para el proceso de operación de residuos peligrosos efectuado por MATPEL en la Universidad de Concepción:

