

Validación de la metodología para la determinación analítica de ácidos grasos en sangre humana

Validation of the methodology for the analytical determination of fatty acids in human blood



Extracción de sangre en yema del dedo

Trabajo de Fin de Grado

JOSE DOMINGO SANTANA RAMOS

Tutorizado por José Antonio Pérez Pérez y Nieves Marta Díaz Gómez

Grado en Biología. Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología.
Universidad de La Laguna. Junio 2022.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Abstract	1
3. Introducción	3
3.1. Ácidos grasos y el cuerpo humano.....	3
3.2. Ácidos grasos y salud.....	4
3.3. Consumo de ácidos grasos en la dieta occidental.....	5
3.4. Medición de ácidos grasos en sangre	6
4. Objetivos	8
5. Material y Métodos	9
5.1. Diseño experimental.....	9
5.2. Obtención de las muestras de sangre.....	9
5.3. Extracción de lípidos.....	10
5.4. Transmetilación de lípidos y purificación de EMAGs.....	11
5.5. Cromatografía de gases	13
5.6. Análisis estadístico.....	13
6. Resultados y discusión	14
6.1. Comparación de las metodologías analíticas de la sangre.....	14
a) Transmetilación directa sin filtro y con filtro.....	14
b) Tratamiento lípido total vs con filtro	14
6.2. Análisis de la conservación de ácidos grasos.....	18
6.3. Efecto del papel de filtro	20
6.4. Composición de las principales familias de ácidos grasos en sangre.....	20
7. Conclusiones	22
8. Conclusions	22
9. Bibliografía	23
10. Anexo 1	24

1. Resumen

En la sanidad es de elevada relevancia establecer buscar métodos analíticos fiables para determinar los perfiles de ácidos grasos en sangre de forma más rápida que los métodos convencionales. Por todo ello, han surgido nuevos métodos que intentan lograr los mismos resultados con metodologías no invasivas y más reducidas en personal y costes. Uno de estos novedosos métodos es el análisis a través de una transmetilación directa, mediante el uso de discos de papel de filtro, en los que se depositan gotas de sangre obtenidas por punción con lancetas en la yema de los dedos. En este estudio, se intenta validar este método analizando los perfiles de ácidos grasos de muestras de sangre que se compararán con otros obtenidos por transmetilación directa sin filtro y transmetilación indirecta. Además, como procedimiento adicional, se comprobará el estado de conservación de las muestras tras una semana de almacenamiento en nevera en presencia de butilhidroxitolueno (BHT) como agente antioxidante. Los resultados obtenidos en el estudio respaldan la viabilidad de este método en la determinación de perfiles de ácidos grasos en una gota de sangre, al no encontrar diferencias significativas con los otros métodos utilizados. También quedó comprobado el buen estado de las muestras tras la conservación con BHT.

Palabras clave: Ácidos grasos; Sangre; Transmetilación directa; Yema del dedo; Butilhidroxitolueno (BHT)

2. Abstract

In healthcare, it is highly relevant to establish reliable analytical methods to determine blood fatty acid profiles faster than conventional methods. Therefore, new methods have emerged that attempt to achieve the same results with non-invasive methodologies and reduced personnel and costs. One of these new methods is the analysis through direct transmethylation, using filter paper discs on which blood drops obtained by lancet puncture are deposited on the fingertips. In this study, the aim is to validate this method by analysing the fatty acid profiles of blood samples which will be compared with those obtained by direct transmethylation without filter and indirect transmethylation. In addition, as a further procedure, the shelf life of the samples will be tested after one week of storage in refrigeration in the presence of butylated hydroxytoluene (BHT) as antioxidant agent. The results obtained in the study support the feasibility of this method

for the determination of fatty acid profiles in a drop of blood, as no significant differences were found with the other methods used. The good condition of the samples after preservation with BHT was also verified.

Keywords: Fatty acids; Blood; Direct transmethylation; Fingertip; Butylatedhydroxytoluene (BHT)

Introducción

3. Introducción

3.1. Ácidos grasos y el cuerpo humano

Los lípidos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los ácidos grasos son los componentes principales de diferentes tipos de lípidos como los triglicéridos, fosfolípidos y otros lípidos complejos. Estas biomoléculas influyen en multitud de propiedades fisiológicas, pudiendo provocar, alteraciones en el metabolismo, la expresión génica, la capacidad de respuesta a las hormonas y los patrones de producción de sustancias biológicamente activas. Además, los ácidos grasos pueden afectar a la salud y el bienestar animal, y al riesgo a padecer enfermedades (Calder, 2015).

Los triglicéridos y, por lo tanto, los ácidos grasos, son los principales contribuyentes de la grasa dietaria en humanos. Los alimentos contienen diferentes cantidades de grasa y tipos de ácidos grasos, y estos pueden verse afectados por los métodos de procesamiento, almacenamiento y cocción. Los seres humanos que siguen una dieta variada consumirán variedad de ácidos grasos a diario, por lo que el patrón de consumo se ve modificado de una estación a otra, de un día a otro, e incluso, de una comida a otra. Además, en el consumo de ácidos grasos se observa variaciones con el envejecimiento, la zona geográfica, ubicación y prácticas culturales y religiosas (Calder, 2015).

En personas sanas, la mayoría de los ácidos grasos consumidos en la dieta (aproximadamente > 95%) están disponibles a través del torrente sanguíneo gracias a la digestión y absorción de nutrientes en el aparato digestivo. Los ácidos grasos pueden ser sintetizados en el cuerpo humano, ya sea a partir de precursores no lipídicos como la glucosa, o a partir de otros ácidos grasos de menor número de átomos de carbono en su molécula, aunque existen ácidos grasos esenciales, que no pueden ser biosintetizados *de novo* por el organismo, y por lo tanto, deben ser ingeridos a través de la dieta (Calder, 2015).

Los ácidos grasos se transportan en el torrente sanguíneo principalmente asociados a lipoproteínas, aunque algunos ácidos grasos no esterificados (NEFA, *non-esterified fatty acids*) circulan de manera “libre” (Calder, 2015).

Dentro de las principales funciones biológicas de los ácidos grasos se encuentra el servir como fuente de energía a través de su oxidación, siendo crucial cuando hay poca

disponibilidad de glucosa en el organismo. Es importante saber que todos los ácidos grasos se pueden oxidar, y que el rendimiento energético depende de la estructura molecular del ácido graso. Otro papel destacado de estas biomoléculas es su función estructural, formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular, aunque dependiendo del tipo celular, la composición de los ácidos grasos variará, provocando cambios en la fluidez de las membranas. Esto último, puede verse influenciado por la dieta, el metabolismo, el entorno hormonal, el estado de activación celular y la genética, entre otros factores. Además, los lípidos de la membrana son precursores de moléculas involucradas en los procesos de señalización celular, y existe evidencia de que la composición de ácidos grasos de las moléculas de señalización influye en su actividad biológica. Así por ejemplo, ácidos grasos saturados como el ácido mirístico (14:0) y el ácido palmítico (16:0) tienen funciones específicas en la acilación de proteínas de membrana que son importantes para anclarlas a la membrana plasmática, mientras que el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) es un ácido graso poliinsaturado (PUFA, *polyunsaturated fatty acid*) de la familia n-6, principal precursor para la producción de eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que tienen múltiples funciones reguladoras (Calder, 2015).

Otra función biológica de los ácidos grasos es regular la expresión o la actividad de los factores de transcripción, ejerciendo un control de la expresión génica y de la producción de proteínas por parte de las células. Estos efectos, permiten que los ácidos grasos regulen procesos metabólicos como la síntesis y oxidación de ácidos grasos, el ensamblaje y eliminación de lipoproteínas, la sensibilidad a la insulina y la inflamación.

Por lo tanto, es evidente que los ácidos grasos, incluso los que se consumen comúnmente a través de la dieta, presentan actividades biológicas específicas que influyen en el metabolismo, funciones y respuestas hormonales y otras señales de las células y tejidos del organismo (Calder, 2015).

3.2. Ácidos grasos y salud

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo la principal causa de muerte en todo el mundo. El riesgo de padecer una de estas enfermedades, se puede reducir cambiando factores de riesgo conductuales, como una dieta poco saludable, la inactividad física y el consumo de tabaco y alcohol.

Dadas las funciones que presentan los ácidos grasos en el metabolismo humano, se han desarrollado gran variedad de estudios sobre la relación existente entre el consumo de grasas y la salud. De hecho, la ingesta dietaria de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (n-3 PUFA) y particularmente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) omega-3 como el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6n-3) se ha asociado positivamente con un desarrollo infantil óptimo, protección cardiovascular, prevención de enfermedades neurodegenerativas, trastornos del comportamiento y mejora de las defensas inmunitarias (Marangoni et al., 2004; Zárate et al., 2017; McBurney et al., 2021).

Asimismo, diversos estudios han demostrado que EPA y DHA tienen efectos cardioprotectores, mediados por varios mecanismos, incluido el antiarrítmico, antitrombosis, reductores de niveles plasmáticos de triacilglicerol y reducción de la frecuencia cardíaca. Se ha propuesto una ingesta de 750 mg/día de estos dos ácidos grasos como cantidad ideal para conseguir beneficios antiarrítmicos significativos, así como, otros beneficios cardiovasculares (Armstrong et al., 2007). Los beneficios de estos ácidos grasos quedaron patentes en un estudio que se llevó a cabo en la década de 1970, sobre las poblaciones inuit de Groenlandia, que estableció que, a pesar de la alta ingesta de lípidos, las enfermedades cardíacas y otras enfermedades inflamatorias estaban prácticamente ausentes en estas poblaciones y que el efecto protector estaba relacionado con una alta ingesta de pescado (Bell et al., 2011).

3.3. Consumo de ácidos grasos en la dieta occidental

La dieta occidental es rica en alimentos procesados y escasa en productos de origen marino, lo que supone una ingesta elevada de omega-6 PUFA. La mayoría de los aceites de semillas y vegetales que se utilizan en la cocina son fuentes importantes de omega-6 PUFA en forma de ácido linoleico (LA, 18:2n-6), teniendo bajas proporciones de ácidos grasos omega-3 (Balić et al., 2020). Esto se ha visto reflejado en que en los últimos 100 años ha habido un rápido aumento de las patologías inflamatorias como son las ECV (Bell et al., 2011).

A diferencia de los ácidos grasos omega-6, la ingesta de omega-3 en la población actual suele ser insuficiente debido a que sus fuentes son limitadas. Así, por ejemplo, el ácido alfa-linolénico (ALA, 18:3n-3) se encuentra en las verduras de hoja verde, la linaza, nueces, soja y aceites de canola, mientras que sus derivados, EPA y DHA, se obtienen a

través de la leche materna, de pescados como el salmón, la caballa, la sardina, la anchoa, el arenque y la trucha arcoíris, y también de las algas. Los peces marinos salvajes de agua fría son ricos en omega-3 PUFA, ya que la mayoría de ellos se alimentan de fitoplancton y zooplancton, una fuente rica en estos ácidos grasos. Por otro lado, omega-6 PUFA como el ácido gamma-linolénico (GLA, 18:3n-6), se encuentra en la leche humana y en algunos aceites de semillas vegetales, mientras que el ARA se obtiene de una dieta rica en vísceras, aves y huevos. En las dietas occidentales típicas, la proporción omega-6/ omega-3 es de 15:1 a 16,7:1, aunque la proporción recomendada varía de 1:1 a 4:1. En los alimentos de origen vegetal y animal, la mayoría de los PUFA se encuentran en forma de triacilgliceroles (TAG), fosfolípidos (PL), diacilgliceroles (DAG) y ésteres de colesterol (CE). Los aceites de krill antártico, que están formados de PUFA omega-3 en forma de PL, se están volviendo más populares como suplemento omega-3. Además de los complementos alimenticios, podemos encontrar muchos alimentos y fórmulas de alimentación infantil fortificadas con microalgas y DHA provenientes del pescado (Balić et al., 2020).

3.4. Medición de ácidos grasos en sangre

Determinados biomarcadores sanguíneos pueden ser indicadores del estilo de vida y la alimentación de las personas. Estos biomarcadores podrían ayudar a identificar pacientes en riesgo de padecer determinadas enfermedades y ser útiles para desarrollar estrategias preventivas y reducir el riesgo de morbilidad y mortalidad. Entre estos biomarcadores se encuentran los ácidos grasos, que se pueden medir en el plasma o en las membranas de los glóbulos rojos (McBurney et al., 2021). De hecho, los ácidos grasos de una muestra de sangre son representativos del *pool* total de ácidos grasos disponible en la circulación con fines estructurales, metabólicos y energéticos (Marangoni et al., 2007).

Los métodos para determinar y cuantificar los ácidos grasos en la sangre han ido evolucionando y perfeccionándose a lo largo del tiempo. Los métodos clásicos han utilizado distintas fracciones sanguíneas que incluyen eritrocitos, ácidos grasos de lípidos totales y polares en plasma, así como sangre total. Algunos inconvenientes de estos métodos analíticos convencionales que miden los ácidos grasos en sangre venosa de la vena antecubital son el tiempo y los costes que conllevan. Estos métodos no siempre son aplicables para niños o pacientes vulnerables, en los que puede haber dificultad para la

extracción de sangre (Marangoni et al., 2007) y, por otro lado, son métodos complejos que consumen mucho tiempo (preparación de muestras, extracción de lípidos, etc.) y costosos ya que requieren la intervención de personal de salud e instalaciones médicas donde realizar las extracciones de sangre (Marangoni et al., 2004).

Por lo general, los pasos a seguir en estos procedimientos analíticos son: extracción de sangre por venopunción, separación de los eritrocitos por centrifugación, extracción de los lípidos con solventes orgánicos, aislamiento de la fracción de lípidos polares, metilación y purificación para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) antes de separarlos y cuantificarlos por cromatografía de gases. Este proceso puede tardar de 4 a 5 días desde la entrega de la muestra hasta el informe de los resultados (Marangoni et al., 2007).

Actualmente, existe la necesidad de un sistema económico, rápido, mínimamente invasivo, preciso y validado para medir las proporciones de LC-PUFA que reflejen la ingesta dietética de ácidos grasos esenciales de un individuo y que proporcione una evaluación de riesgo de salud válida para pacientes individuales (Marangoni et al., 2007). Este enfoque analítico puede facilitar estudios dedicados al cribado y seguimiento de grupos de población de particular interés, como, por ejemplo, lactantes, mujeres embarazadas, ancianos o personas enfermas, que al ser usuarios vulnerables y con dificultad a la hora de realizar análisis con métodos convencionales, aún no se han investigado adecuadamente (Marangoni et al., 2004).

Actualmente disponemos de un nuevo enfoque analítico simplificado para la evaluación del perfil de ácidos grasos en una gota de sangre, recolectada con un procedimiento esencialmente no invasivo haciendo una punción con una lanceta en la yema del dedo y así facilitar este tipo de evaluaciones (Marangoni et al., 2007). El método utiliza la metilación directa de sangre capilar de las yemas de los dedos absorbida en un papel de cromatografía. La principal ventaja de este método es que simplifica la recolección de muestras de sangre y reduce una cantidad significativa de tiempo analítico y de los costes resultantes (Min et al., 2011).

Objetivos

4. Objetivos

El presente estudio pretende validar un método rápido y no invasivo para analizar ácidos grasos en una gota de sangre obtenida por punción en la yema de los dedos, con el propósito de establecer un método que sea más rápido, con menos costes económicos y que pueda ser aplicable a grupos grandes de personas, sin necesidad de un personal sanitario especializado para obtener las muestras.

En base a ello, el objetivo general de este trabajo fin de grado es:

- Comprobar la eficacia de un método que utiliza la transmetilación directa de sangre recogida en filtros de papel, para medir el perfil de ácidos grasos sin necesidad de hacer extracción previa de lípidos.

Para llevar a cabo este objetivo general, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar los perfiles de ácidos grasos obtenidos a través de tres técnicas distintas: transmetilación directa con filtro, transmetilación directa sin filtro y transmetilación indirecta a partir de los lípidos obtenidos de la muestra de sangre.
2. Valorar los resultados de un perfil de ácidos grasos después de un periodo de almacenamiento de una semana con un agente antioxidante, butilhidroxitolueno (BHT).

Material y métodos

5. Material y Métodos

5.1. Diseño experimental

Para la comprobación de la metodología se llevó a cabo dos procedimientos diferentes:

1.- Con la finalidad de descartar la interferencia del papel de filtro en los resultados, se tomaron dos muestras de sangre, una fue analizada mediante transmetilación directa sobre el papel de filtro (TDCF) y la otra sin la presencia de éste (TDSF). Además, se realizó una comprobación analítica del papel de filtro sin muestra de sangre para comprobar si había detección de picos en el cromatograma. Por otro lado, se recogió una muestra adicional que fue tratada a través de la metodología tradicional, haciendo una transmetilación indirecta, es decir, se extrajo los lípidos a la sangre y a partir de éstos, se prepararon los ácidos grasos (TICF). Esta última muestra nos sirvió para comparar la transmetilación directa y la indirecta.

2.- En un segundo experimento se quiso comprobar si había variación en la composición de EMAG de la sangre analizada en el momento de la extracción (TICF-1) al conservarla en nevera a una temperatura de 4°C durante un periodo de una semana (TICF-7). En base a los resultados obtenidos en el experimento anterior, en esta fase se empleó papel de filtro. Para conservar las muestras, se le añadió 5 µL de una solución del antioxidante BHT (Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.) en etanol al 99,8% de pureza, (Panreac AppliChem, ITW Reagents, Illinois, EE. UU.). Esta solución tenía una concentración de 5 mg/mL, que fue preparada con anterioridad disolviendo 30,7 mg de BHT en 6,14 mL de etanol.

5.2. Obtención de las muestras de sangre

La sangre fue obtenida a través de una punción con microlancetas estériles en las yemas de los dedos corazón o anular de la mano no dominante. Se extrajo sangre a 12 voluntarios, de los cuales 6 eran mujeres y 6 varones con edades comprendidas entre los 21 y 50 años de edad y no presentaban patologías relevantes. En todos ellos se recogió una encuesta sobre sus hábitos de alimentación (ANEXO 1) y resultó que algunos de los voluntarios seguían dietas como la vegana, vegetariana o consumían baja cantidad de pescado. A 9 de estos voluntarios se les sacó un total de 3 gotas de sangre, para la transmetilación directa con o sin filtro y para la transmetilación indirecta; mientras que las muestras de los 5 restantes fueron empleadas para comprobar la conservación de éstas tras la adición de BHT.

El procedimiento de extracción de la sangre fue el siguiente: previo a la extracción, los voluntarios realizaron un breve ejercicio para acelerar el pulso sanguíneo, se desinfectaron las manos con agua y jabón, una vez la zona se encontraba desinfectada, se procedía a masajear el dedo seleccionado para la punción, se pinchó con la lanceta en la yema del dedo, se descartó la primera gota de sangre, y se ejerció una pequeña presión en el dedo para que fuera saliendo más sangre. Finalmente, con una pipeta de 100 μL de capacidad, se recogió un volumen aproximado de 50 μL por muestra.

En tubos de ensayo rotulados con el nombre de cada voluntario y el tratamiento analítico que se iba a desarrollar sobre las muestras, se introdujo cada gota de sangre. En el caso de los tratamientos que requerían transmetilación directa con filtro (TDCF), la muestra se depositó en unos discos de papel de filtro (PerkinElmer 226 Spot Saver Card, Greenville, EE. UU.), que recortados previamente. Por último, se evaporó con gas nitrógeno toda la fracción líquida de las muestras para transmetilación directa, antes de añadirle el solvente orgánico correspondiente.

5.3. Extracción de lípidos

Para la transmetilación indirecta (TI), hay que proceder previamente a la extracción lipídica. Dicha extracción se llevó a cabo mediante el método de Folch et al. (1957) modificado por Christie (1982), utilizando 10 mL de cloroformo:metanol (CL:Met, 2:1). Una vez introducida la sangre en un tubo de ensayo con la mezcla de solventes orgánicos, se agitó vigorosamente con vórtex. Seguidamente, se añadió 2,5 mL de KCl al 0,88 % (p/v) y se agitó con vórtex, formándose dos fases, una orgánica inferior y otra acuosa, superior, donde el KCl aumenta la tensión superficial entre las fases, la cual arrastra la fracción acuosa, parte de metanol y todos los compuestos polares. A continuación, se centrifugaron los tubos 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. Tras la centrifugación, se obtuvieron dos fases bien diferenciadas, recogándose con una pipeta Pasteur el contenido de la fase inferior donde se encuentra el solvente orgánico con los lípidos. Esta fase inferior se filtró y se trasvasó a un nuevo tubo de ensayo, evaporándose el solvente en atmósfera de nitrógeno. Durante todo el proceso se trabajó en condiciones de frío para evitar la oxidación de los lípidos. Finalmente, los lípidos se trasvasaron a un vial previamente pesado, se evaporó nuevamente el solvente y se mantuvo al vacío y en oscuridad durante toda la noche. Pasado este tiempo, se determinó el contenido lipídico de la muestra por gravimetría.

Los lípidos fueron resuspendidos en CL:Met conteniendo BHT al 0,01% como antioxidante, a una concentración de 10 mg/mL y se mantuvieron a -20°C en atmósfera de nitrógeno hasta continuar con su transmetilación y la purificación de los EMAGs así obtenidos.

5.4. Transmetilación de lípidos y purificación de EMAGs

El proceso de transmetilación se llevó a cabo en todas las muestras experimentales, con la diferencia de que las muestras con el tratamiento de transmetilación directa con filtro (TDCF) y transmetilación directa sin filtro (TDSF), este es su primer paso experimental, y las muestras de transmetilación indirecta ya han sufrido un proceso previo de extracción de sus lípidos.

Para las muestras procedentes de la extracción lipídica se sacaron los viales del congelador a -20 °C y con una jeringa Hamilton se resuspendió el contenido de los viales con CL:Met (2:1), para así arrastrar todos los lípidos posibles y pasarlos a tubos de ensayo. Se añadió un 5% de estándar interno (ácido nodecanoico, 19:0) a todas las muestras de lípidos para poder cuantificar los ácidos grasos en unidad de peso por volumen (mg/dL sangre). Las muestras en los tubos de ensayo fueron evaporadas con atmósfera de nitrógeno.

Los siguientes pasos son en común tanto para el tratamiento de transmetilación directa como indirecta:

Se añadió 1 mL de tolueno para facilitar la disolución de los lípidos menos polares y 2 mL de metanol en ácido sulfúrico al 1% (MeOH:H₂SO₄) para metilar las muestras. Seguidamente, los tubos de ensayo fueron agitados con vórtex y puestos en una manta calefactora a 50 °C durante 17 horas en atmósfera de nitrógeno.

Una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar y a cada muestra se le añadió 2 mL de KHCO₃ al 2% y 5 mL de Hex: Eter (hexano:dietil-éter) a una proporción 1:1 y con un 0,01% de BHT. Se centrifugó a 1500 rpm, durante 5 minutos a 4 °C, y a continuación se procedió a recoger con una pipeta Pasteur la fase superior, que pasó a tubos de ensayo limpios. La fase inferior se volvió a lavar con 5 mL más de Hex:Eter (1:1) sin BHT y se introdujo en la centrifuga bajo las mismas condiciones. Nuevamente, la fase superior fue transferida al tubo de ensayo limpio y el solvente evaporado bajo atmósfera de nitrógeno.

Pasado el tiempo en el que se tarde de evaporar el hexano:eter en su totalidad, las muestras fueron resuspendidas en 100 µL de hexano. A continuación, tendría lugar el proceso de purificación, para ello, se utilizó una técnica de cromatografía en capa fina (TLC, del inglés, *Thin Layer Chromatography*) que utiliza como fase estacionaria unas

placas de sílice de 20 x 20 mm x 0,25 mm, de la casa comercial Macherey-Nagel de Alemania; y como fase móvil una solución compuesta de 90 mL de hexano, 10 mL de éter y 1 mL de ácido acético (90:10:1; v/v/v). Para inyectar las muestras en las placas se marcó con un lápiz de grafito blando las zonas donde se depositó cada muestra y el estándar externo. Generalmente, se suele dejar 1,5 cm de margen inferior y 1 cm de margen superior que marca hasta donde llegará la fase móvil. En el margen inferior izquierdo se deja 1,5 cm de separación para trazar una línea donde se va a inyectar el estándar externo, y con 2 cm de distancia sucesivamente se va marcando las líneas donde se van a inyectar el resto de las muestras, las cuales tendrán una longitud de 2 cm. En cada placa de sílice caben alrededor de 4 muestras y el estándar. Dicho estándar externo sirve para indicarnos la posición de los ésteres metílicos en la placa, una vez la cromatografía haya concluido y se suele echar una cantidad de 50 μ L por placa.

Para inyectar las muestras en la placa se usó una jeringa Hamilton, donde se iba añadiendo las muestras en sus marcas correspondientes. Además, para lavar y arrastrar bien los ésteres metílicos de ácidos grasos, se añadió 50 μ L más de hexano a los tubos. Por lo general, se debe inyectar las muestras en la placa a una concentración de 1mg/cm. Una vez se prepara las placas con las muestras inyectadas se introducen en una cubeta, donde ya se encuentra la solución de hexano, éter y ácido acético, y se deja desarrollar la cromatografía.

Transcurrido este tiempo, se relevó con iodina y CHCl_3 al 1% el bandeo del estándar externo y las marcas de BHT correspondientes con el resto de las muestras. Una vez insinuadas las posiciones de los ácidos grasos se traza con un lápiz de grafito blando los cuadrantes donde se deben encontrar. Los cuadrantes donde se encontraban los ácidos grasos de cada muestra son raspados y el polvo de sílice resultante es recogido en tubos de ensayo nuevos donde se purifican y disuelven en 10 mL de Hex:Eter, para así pasar las moléculas de ácidos grasos de la sílice al disolvente de Hex:Eter. Los 10 mL de Hex:Eter están compuestos de 2 mL de Hex:Eter con BHT al 0,01% y los otros 8 mL de Hex:Eter sin BHT.

A continuación, se agitó los tubos en vórtex y se centrifugaron a 1500 rpm, 4 °C, 5 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, con pipetas Pasteur se recogió todo el Hex:Eter y se traspasó a tubos limpios, los cuales se evaporaron en atmósfera de nitrógeno, seguidamente.

Por último, las muestras evaporadas fueron resuspendidas en 600 μ de hexano que se transfieren a viales etiquetados para guardar las muestras en el congelador a -20 °C con atmósfera de nitrógeno hasta el momento de la inyección en el cromatógrafo de gases.

5.5. Cromatografía de gases

La determinación de los ácidos grasos presentes en las muestras de sangre, se realizó por cromatografía de gases (GC-ULTRA TRACE; Thermo Scientific) con detector de ionización de llama FID (*Flame Ionitiation Detector*) e inyección en columna, bajo condiciones específicas. Entre ellas, el flujo de los gases, que está compuesto por helio, que actúa como gas portador (1,5 mL/min), hidrógeno (35 mL/min) y aire (350 mL/min); la columna de sílice fundida SupelcowaxTM 10 (Supelco Inc., Bellefonte, EE. UU) (30 m x 0,32 mm I.D, 0,25 μ m de espesor) con fase estacionaria polar. La temperatura del Inyector (*On Column*) es de 50°C, el Detector FID está a 240°C y la Columna con rampas de temperatura tiene las siguientes fases de temperatura: parte de una temperatura inicial de 50°C, va incrementando su temperatura con una tasa de crecimiento de 40°C/min hasta alcanzar los 150°C, una vez llegue a los 150°C la tasa de incremento cambia y pasa a ser de 2°C/min hasta los 200°C, a partir de los 200°C el incremento es de 1°C/min para llegar a 214°C, y por último, la tasa de crecimiento es de 40°C/min para alcanzar los 230°C/min que se mantendrá unos 5 minutos.

Para identificar y cuantificar en porcentajes los ácidos grasos en los cromatogramas resultantes, se compara con un estándar comercial de composición conocida.

5.6. Análisis estadístico

Previo al análisis, el ajuste de los datos a la normalidad dentro de los grupos fue confirmada y en caso necesario, los datos fueron transformados usando la transformación inversa, logarítmica o la del arcoseno de la raíz cuadrada. Si los datos que se querían comparar cumplían con la normalidad, determinada con el test de Shapiro-Wilk debido a los tamaños muestrales (n=9; n=5), se procedió a realizar una t de Student para determinar si existían diferencias significativas entre ellos. La significación estadística empleada fue $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando la plataforma de software IBM® SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp., Nueva York, USA) para Windows.

Resultados y discusión

6. Resultados y discusión

6.1. Comparación de las metodologías analíticas de la sangre

a) Transmetilación directa sin filtro y con filtro

El primer análisis estadístico llevado a cabo fue la comparación entre los tratamientos de transmetilación directa, con y sin el empleo del filtro (TDCF vs TDSF). (Tabla 1).

Los resultados obtenidos demuestran que no hay diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos de la sangre obtenido con ambas metodologías ($p > 0,05$), excepto para los ácidos grasos saturados 20:0 y 22:0, que aumentaron su proporción significativamente con el empleo del en comparación con el resto. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 1, son ácidos grasos con representación escasa en las muestras analizadas por lo que no tienen relevancia en el perfil completo.

b) Tratamiento lípido total vs con filtro

Como se muestra en la Tabla 2, la siguiente comparación analítica consistió en el análisis mediante transmetilación indirecta y directa, ambas con filtro (TICF vs TDCF).

En esta comparación, se vuelve a destacar la presencia de determinados ácidos grasos con un p -valor $< 0,05$, ácidos grasos saturados de 15 y 22 átomos de carbono, así como el poliinsaturado 20:2n-6, los cuales representan, como el caso anterior, porcentajes bajos en los perfiles. Cabe mencionar que los dimetilacetales (DMA) también, presentan diferencias significativas entre los tratamientos, los cuales tienen mayor presencia en la transmetilación directa con respecto al sistema tradicional.

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos (% del total de AG) de sangre humana procesada por transmetilación directa sin filtro (TDSF) y la transmetilación directa con filtro (TDCF).

Ácidos grasos	TDSF	TDCF
14:0	0,66 ± 0,16	0,64 ± 0,17
15:0	0,29 ± 0,10	0,23 ± 0,03
16:0	21,99 ± 2,11	21,90 ± 2,21
17:0	0,23 ± 0,09	0,27 ± 0,03
18:0	10,42 ± 1,54	10,44 ± 1,31
19:0	0,34 ± 0,25	0,30 ± 0,18
20:0*	0,13 ± 0,13	0,24 ± 0,05
22:0*	0,36 ± 0,05	0,55 ± 0,09
24:0	0,70 ± 0,16	0,73 ± 0,12
<i>Total SFA¹</i>	35,11 ± 3,12	35,32 ± 2,76
16:1n-9	0,91 ± 0,52	0,87 ± 0,54
16:1n-7	0,63 ± 0,67	0,58 ± 0,62
18:1n-9	21,12 ± 3,84	21,29 ± 4,00
18:1n-7	2,77 ± 0,74	2,23 ± 0,31
20:1n-9	0,06 ± 0,11	0,12 ± 0,15
24:1n-9	0,50 ± 0,18	0,56 ± 0,13
<i>Total MUFA¹</i>	26,20 ± 3,93	25,79 ± 3,73
16:0 DMA	0,98 ± 0,21	0,95 ± 0,22
18:0 DMA	1,40 ± 0,27	1,39 ± 0,26
18:1n-9 DMA	0,40 ± 0,10	0,39 ± 0,11
<i>Total DMA</i>	3,10 ± 0,88	2,73 ± 0,58
18:2n-6 (LA)	20,03 ± 2,35	20,44 ± 1,31
18:3n-6	0,42 ± 0,14	0,39 ± 0,14
20:2n-6	0,27 ± 0,11	0,30 ± 0,05
20:3n-6	1,32 ± 0,32	1,37 ± 0,32
20:4n-6 (ARA)	7,64 ± 1,71	7,94 ± 0,84
22:4n-6	1,00 ± 0,31	1,04 ± 0,28
22:5n-6	0,74 ± 0,29	0,51 ± 0,32
<i>Total n-6 PUFA</i>	31,42 ± 3,88	31,98 ± 1,61
18:3n-3 (ALA)	0,20 ± 0,13	0,24 ± 0,15
18:4n-3	0,15 ± 0,18	0,15 ± 0,12
20:5n-3 (EPA)	0,26 ± 0,20	0,23 ± 0,20
22:5n-3	0,53 ± 0,16	0,51 ± 0,17
22:6n-3 (DHA)	1,52 ± 0,81	1,68 ± 0,61
<i>Total n-3 PUFA</i>	2,65 ± 1,08	2,83 ± 0,91
<i>Total n-3 LC-PUFA</i>	2,30 ± 1,11	2,43 ± 0,93
<i>Total n-6 LC-PUFA</i>	10,97 ± 2,04	11,15 ± 1,09
<i>n-3/n-6</i>	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,03
<i>ARA/EPA</i>	34,61 ± 14,34	41,14 ± 19,66
<i>DHA/EPA</i>	5,98 ± 2,13	7,95 ± 3,20
<i>ARA/DHA</i>	6,62 ± 4,44	5,12 ± 1,35

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 9). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; DMA, dimetilacetales. * indica diferencias

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

significativas entre tratamientos analíticos ($p < 0,05$). ¹ Incluyen otros ácidos grasos que representan $< 0,10\%$ del total.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos (% del total de AG), porcentaje de lípido y total de ácidos grasos (mg/dL) de sangre humana procesada por transmetilación indirecta (TI) y transmetilación directa con filtro (TDCF).

Ácidos grasos	TI	TDCF
14:0	0,79 ± 0,15	0,64 ± 0,17
15:0*	0,33 ± 0,05	0,23 ± 0,03
16:0	22,01 ± 1,98	21,90 ± 2,21
17:0	0,29 ± 0,03	0,27 ± 0,03
18:0	10,48 ± 1,09	10,44 ± 1,31
19:0		0,30 ± 0,18
20:0	0,25 ± 0,05	0,24 ± 0,05
22:0*	0,36 ± 0,04	0,55 ± 0,09
24:0	0,64 ± 0,09	0,73 ± 0,12
<i>Total SFA¹</i>	35,15 ± 2,64	35,32 ± 2,76
16:1n-9	0,96 ± 0,41	0,87 ± 0,54
16:1n-7	0,65 ± 0,66	0,58 ± 0,62
18:1n-9	24,10 ± 3,38	21,29 ± 4,00
18:1n-7	2,23 ± 0,47	2,23 ± 0,31
18:1n-5	0,11 ± 0,17	0,02 ± 0,06
20:1n-9	0,18 ± 0,13	0,12 ± 0,15
24:1n-9	0,62 ± 0,10	0,56 ± 0,13
<i>Total MUFA¹</i>	29,04 ± 3,25	25,79 ± 3,73
16:0 DMA*	0,71 ± 0,14	0,95 ± 0,22
18:0 DMA*	1,02 ± 0,14	1,39 ± 0,26
18:1n-9 DMA	0,32 ± 0,08	0,39 ± 0,11
<i>Total DMA*¹</i>	2,04 ± 0,34	2,73 ± 0,58
18:2n-6 (LA)	19,19 ± 2,17	20,44 ± 1,31
18:3n-6	0,29 ± 0,19	0,39 ± 0,14
20:2n-6*	0,22 ± 0,09	0,30 ± 0,05
20:3n-6	1,22 ± 0,36	1,37 ± 0,32
20:4n-6 (ARA)	7,04 ± 1,36	7,94 ± 0,84
22:4n-6	0,94 ± 0,27	1,04 ± 0,28
22:5n-6	0,49 ± 0,32	0,51 ± 0,32
<i>Total n-6 PUFA</i>	29,38 ± 3,92	31,98 ± 1,61
18:3n-3 (ALA)	0,36 ± 0,09	0,24 ± 0,15
18:4n-3	0,11 ± 0,18	0,15 ± 0,12
20:5n-3(EPA)	0,27 ± 0,19	0,23 ± 0,20
22:5n-3	0,49 ± 0,10	0,51 ± 0,17
22:6n-3 (DHA)	1,72 ± 0,63	1,68 ± 0,61
<i>Total n-3 PUFA</i>	2,96 ± 0,87	2,83 ± 0,91
<i>Total n-3 LC-PUFA</i>	2,48 ± 0,90	2,43 ± 0,93
<i>Total n-6 LC-PUFA</i>	9,90 ± 2,01	11,15 ± 1,09

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<i>n-3/n-6</i>	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,03
<i>ARA/EPA</i>	30,02 ± 14,28	41,14 ± 19,66
<i>DHA/EPA</i>	6,64 ± 2,06	7,95 ± 3,20
<i>ARA/DHA</i>	4,36 ± 1,02	5,12 ± 1,35
% Lípido p.f.	0,23 ± 0,06	
Total de ácidos grasos	254,49 ± 94,64	

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 9). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; DMA, dimetilacetales. * indica diferencias significativas entre tratamientos analíticos ($p < 0,05$)¹ Incluyen otros ácidos grasos que representan $< 0,10\%$ del total.

Estos resultados confirman que no existen diferencias significativas entre las metodologías aplicadas para el análisis de ácidos grasos en la sangre. Tanto la comparación entre los dos tipos de transmetilaciones directas, como la transmetilación directa con filtro y la transmetilación indirecta, sugieren que los tres métodos son igual de válidos para cuantificar el perfil de ácidos grasos en sangre. Estos resultados coinciden con el estudio de Marangoni et al. (2004), donde se evaluó la validez del método directo para el plasma en seis sujetos, comprobando que los niveles de porcentaje de ácidos grasos evaluados con el nuevo método frente al método convencional fueron sustancialmente idénticos. Además, sabemos que los DMA, es decir derivados de plasmalógenos de células sanguíneas no interfieren con el análisis de ácidos grasos (Marangoni et al., 2004).

Estos resultados indican que el método directo recién implementado en el laboratorio de Fisiología del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna, es perfectamente válido. Por lo tanto, seguir los pasos para realizar una transmetilación directa con papel de filtro, hace que se lleve a cabo prácticas de extracción no invasivas que ahorran tiempo y dinero, y que sea fácilmente aplicable al análisis de ácidos grasos de un gran número de muestras (Bell et al., 2011; Min et al., 2011). Además, su aplicación no requiere la participación de sanitarios en la recogida de la muestra de sangre y simplifica el procedimiento analítico. Por todo ello, estas determinaciones de alto rendimiento y rentabilidad permitirían grandes iniciativas de investigación y respaldarían la elaboración de perfiles de ácidos grasos de rutina durante el cribado clínico. Esta nueva técnica queda respaldada por diferentes razones prácticas, como prescindir de realizar una extracción previa de lípidos, o que las muestras absorbidas en el papel se puedan transesterificar directamente y ser analizadas por

cromatografía de gases en un tiempo más breve (Marangoni et al., 2004; Armstrong et al., 2007).

Como es sabido, la extracción de sangre venosa de algunos grupos de la población como son los bebés y los ancianos puede resultar difícil y puede plantear problemas éticos (Bell et al., 2011). Por ello, el uso de este método en la población haría que estas personas puedan ser objeto de investigación de una manera más sencilla (Marangoni et al., 2004).

Además, la composición en ácidos grasos de la sangre refleja la ingesta de grasas en la dieta, como es el consumo de pescado y carne, esto último, también se pudo observar en nuestro trabajo, a pesar de no haber efectuado la validación estadística de los resultados al salir fuera del ámbito de este trabajo. Por tanto, el método aporta información útil sobre los hábitos alimentarios de una población y sobre el perfil de AG de un individuo, lo que justifica la validez de su aplicación a estudios preventivos (Marangoni et al., 2004).

6.2. Análisis de la conservación de ácidos grasos

Otra forma de comprobar la validez del método con filtro fue mediante el análisis de muestras sometidas a un periodo de almacenamiento de una semana. Estas muestras fueron comparadas con una homóloga que no se sometió a este periodo. Los resultados tras el análisis estadístico se muestran en la Tabla 3.

Los resultados obtenidos demuestran que no existen diferencias significativas entre ambos perfiles, obteniendo un p-valor mayor a 0,05 en todos los casos, exceptuando el ácido graso saturado 22:0, que difiere en la media en ambos periodos.

Este análisis nos muestra que conservar las muestras durante un periodo de una semana, con un antioxidante lipídico como es el BHT, no altera la composición de los perfiles de ácidos grasos, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Marangoni et al. (2004) y Metherel et al. (2013). Este hecho, además, refuerza la validez del método empleado.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (% del total de AG) de sangre humana procesada por transmetilación directa con filtro el día de extracción (TDCF-1) y tras 7 días en nevera (TDCF-7).

Ácidos grasos	TDCF-1	TDCF-7
14:0	0,72 ± 0,12	0,82 ± 0,14
15:0	0,38 ± 0,34	1,27 ± 2,05
16:0	22,17 ± 1,55	22,51 ± 1,54
17:0	0,06 ± 0,14	0,14 ± 0,13
18:0	11,22 ± 1,44	11,12 ± 1,10
19:0	0,54 ± 0,37	0,20 ± 0,45
20:0	0,24 ± 0,15	0,31 ± 0,25
22:0*	0,15 ± 0,23	0,71 ± 0,30
23:0	0,56 ± 0,54	0,76 ± 0,71
24:0	1,46 ± 0,44	1,23 ± 0,73
<i>Total SFA</i>	41,91 ± 5,35	41,89 ± 5,71
15:1n-5	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,39
16:1n-9	0,55 ± 0,33	0,51 ± 0,23
16:1n-7	0,87 ± 0,59	0,91 ± 0,65
18:1n-9	15,84 ± 1,40	15,45 ± 2,46
18:1n-7	2,19 ± 1,39	2,55 ± 0,67
20:1n-9	0,05 ± 0,12	0,13 ± 0,12
24:1n-9	0,37 ± 0,45	0,18 ± 0,39
<i>Total MUFA^l</i>	19,87 ± 2,10	19,98 ± 2,21
16:0 DMA	0,98 ± 0,18	0,97 ± 0,15
18:0 DMA	1,43 ± 0,26	1,41 ± 0,29
18:1n-9 DMA	0,44 ± 0,06	0,41 ± 0,09
<i>Total DMA</i>	2,85 ± 0,47	2,79 ± 0,51
18:2n-6 (LA)	19,91 ± 1,76	19,91 ± 3,32
18:3n-6	0,52 ± 0,51	0,26 ± 0,15
20:2n-6	0,43 ± 0,31	0,40 ± 0,23
20:3n-6	1,10 ± 0,66	1,20 ± 0,76
20:4n-6 (ARA)	8,15 ± 1,72	7,82 ± 1,67
22:4n-6	0,51 ± 0,71	0,63 ± 0,90
22:5n-6	0,26 ± 0,58	0,52 ± 0,42
<i>Total n-6 PUFA</i>	31,48 ± 3,47	30,90 ± 5,03
18:3n-3 (ALA)	0,26 ± 0,17	0,23 ± 0,14
18:4n-3	0,25 ± 0,15	0,31 ± 0,25
20:5n-3(EPA)	0,28 ± 0,10	0,44 ± 0,31
22:5n-3	0,60 ± 0,09	0,76 ± 0,25
22:6n-3 (DHA)	0,70 ± 0,65	0,76 ± 0,54
<i>Total n-3 PUFA</i>	2,28 ± 0,92	2,51 ± 0,82
<i>Total de n-3 LC-PUFA</i>	1,76 ± 0,95	1,96 ± 0,80

<i>Total de n-6 LC-PUFA</i>	11,05 ± 2,72	10,73 ± 1,70
<i>n-3/n-6</i>	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,03
<i>ARA/EPA</i>	32,95 ± 18,98	25,75 ± 17,24
<i>DHA/EPA</i>	2,31 ± 1,35	2,29 ± 1,65
<i>ARA/DHA</i>	16,64 ± 7,72	13,21 ± 5,49

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 5). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; DMA, dimetilacetales. * indica diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05). ¹ Incluyen otros ácidos grasos que representan <0,10% del total.

6.3. Efecto del papel de filtro

Para descartar la interferencia del papel de filtro sobre los resultados de los perfiles de ácidos grasos en la sangre, se comparó el área total obtenida por la suma de áreas de cada una de las biomoléculas, resultantes tras la transmetilación de un filtro de papel, con el área total de un cromatograma sanguíneo de composición conocida. Se comprobó que el área total de ácidos grasos detectados en la cromatografía de gases del filtro, únicamente representó alrededor de un 5% del área total del cromatograma, por lo que, podría decir que la interferencia del papel de filtro sobre los resultados no es significativa.

6.4. Composición de las principales familias de ácidos grasos en sangre

Es destacable la elevada presencia de los ácidos grasos saturados como el 16:0 y el 18:0 (Tablas 1, 2 y 3), en consonancia con la dieta occidental. Dentro de los monoinsaturados encontramos bastante presencia del 18:1n-9.

La familia de ácidos grasos más relevantes para la salud son los poliinsaturados, tanto los omega-6 como los omega-3. Dentro del primer grupo, se ve que las proporciones de 18:2n-6 (LA) y 20:4n-6 (ARA) son apreciables (Tablas 1, 2 y 3). Por otro lado, los omega-3 no destacan por su gran abundancia en los perfiles, pero son los que presentan mayor interés clínico como son 20:5n-3 (EPA) y 22:6n-3 (DHA) (Tablas 1, 2 y 3). En la dieta occidental actual, las proporciones de omega-6 ingeridas a través de la dieta son mayores que las de omega-3, pero con un consumo adecuado de pescado se pueden elevar los valores de EPA y DHA, lo cual es muy beneficioso para la salud (Marangoni et al., 2007; Bell et al., 2011).

Según el estudio de Bell et al. de 2011, en la actualidad se están encontrando evidencias concluyentes de que un aumento de la ingesta de n-3 PUFA, en particular EPA y DHA, pueden prevenir o atenuar las enfermedades cardiovasculares, así como otras

afecciones con una patología inflamatoria, incluida la diabetes tipo 2, la artritis reumatoide, el asma y algunas formas de cáncer. También hay evidencia del beneficio de consumir n-3 PUFA para un correcto funcionamiento de las retinas oculares y para una variedad de trastornos neurológicos y neurodegenerativos. Por tanto, el creciente interés en conocer el estado de los perfiles de ácidos grasos omega-3 posee relevancia médica para una variedad de afecciones, por lo que conlleva un aumento de la demanda en desarrollar métodos de análisis en sangre más rápidos, precisos y rentables, como es el caso de la transmetilación directa con papel de filtro (Bell et al., 2011).

Conclusiones

7. Conclusiones

1. La recogida de muestras de sangre mediante filtro no afecta a su composición en ácidos grasos.
2. La ausencia de variación en la composición de ácidos grasos entre los perfiles analizados, demuestra que el método de análisis a través de transmetilación directa con filtro es igual de válido que el método tradicional.
3. El empleo de un agente antioxidante, como el butilhidroxitolueno (BHT), permite conservar las muestras de sangre durante un periodo de una semana a 4°C, sin verse afectado su perfil de ácidos grasos.
4. La transmetilación directa de muestras de sangre es un método analítico válido para la determinación de su composición en ácidos grasos, demostrándose su potencial aplicabilidad en el ámbito sanitario.

8. Conclusions

1. Filter collection of blood samples does not affect their fatty acid composition.
2. The absence of variation in fatty acid composition between the profiles analysed demonstrates that the method of analysis by direct transmethylation with filter is as valid as the traditional method.
3. The use of an antioxidant agent, such as butylated hydroxytoluene (BHT), allows blood samples to be preserved for a period of one week at 4oC without affecting their fatty acid profile.
4. Direct transmethylation of blood samples is a valid analytical method for the determination of their fatty acid composition, demonstrating its potential applicability in the health care field.

Bibliografía

9. Bibliografía

Armstrong, J. M., Metherel, A. H., & Stark, K. D. 2007. Direct Microwave. Transesterification of Fingertip Prick Blood Samples for Fatty Acid Determinations. *Lipids*, 43(2), 187–196.

Balić, A., Vlašić, D., ŽUžul, K., Marinović, B., & Bukvić Mokos, Z. 2020. Omega-3 Versus Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 741.

Bell, J.G., Mackinlay, E. E., Dick, J. R., Younger, I., Lands, B., & Gilhooly, T. 2011. Using a fingertip whole blood sample for rapid fatty acid measurement: method validation and correlation with erythrocyte polar lipid compositions in UK subjects. *British Journal of Nutrition*, 106(9), 1408–1415.

Calder, P. C. 2015. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39(1_suppl), 18S-32S.

Marangoni, F., Colombo, C., & Galli, C. 2004. A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip in humans: applicability to nutritional and epidemiological studies. *Analytical Biochemistry*, 326(2), 267–272.

Marangoni, F., Colombo, C., Martiello, A., Negri, E., & Galli, C. 2007. The fatty acid profiles in a drop of blood from a fingertip correlate with physiological, dietary and lifestyle parameters in volunteers. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76(2), 87–92.

McBurney, M. I., Tintle, N. L., Vasan, R. S., Sala-Vila, A., & Harris, W. S. 2021. Using an erythrocyte fatty acid fingerprint to predict risk of all-cause mortality: the Framingham Offspring Cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 114(4), 1447–1454.

Metherel, A. H., Hogg, R. C., Buzikievich, L. M., & Stark, K. D. 2013. Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids in Health and Disease*, 12(1).

Min, Y., Ghebremeskel, K., Geppert, J., & Khalil, F. 2011. Effect of storage temperature and length on fatty acid composition of fingertip blood collected on filter paper. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 84(1–2), 13–18.

Zárate, R., Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. 2017. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1).

ANEXO

10. Anexo 1

IDENTIFICACIÓN: _____

Edad: _____

Sexo:

Hombre

Mujer

¿Sigue alguna dieta especial?

No

Si. Indique que tipo de dieta sigue:

Dieta vegetariana. ¿Desde qué edad sigue una dieta vegetariana?: _____

Dieta vegana. ¿Desde qué edad sigue una dieta vegana?:

Otra dieta. Indique cuál:

¿Desde qué edad sigue esa dieta?: _____

¿Con qué frecuencia acostumbra tomar pescado?:

nunca

diariamente

Semanalmente. Indique el número de veces a la semana que habitualmente toma pescado: _____

Mensualmente. Indique el número de veces al mes que habitualmente toma pescado: _____

¿Habitualmente consume pescado de piscifactoría?: Si No

¿Qué tipo de pescado acostumbra tomar? (Indique el pescado que toma con más frecuencia)

¿Con qué frecuencia acostumbra tomar marisco?:

nunca

diariamente

Semanalmente. Indique el número de veces a la semana que habitualmente toma marisco: _____

Mensualmente. Indique el número de veces al mes que habitualmente toma marisco: _____

¿Qué tipo de marisco acostumbra tomar? (Indique el marisco que toma con más frecuencia)
