



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Departamento de Ingeniería Química**

**Biodisponibilidad de los componentes del  
insaponificable del aceite de oliva en  
humanos**

**TESIS DOCTORAL**

**IMAN KASEM**

**2009**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Ingeniería Química

# **Biodisponibilidad de los componentes del insaponificable del aceite de oliva en humanos**

Memoria que presenta  
Dña **Iman Kasem**  
para optar al Grado de Doctor

Fdo. Iman Kasem

Sevilla, Enero de 2009

**Dña. Valentina Ruiz Gutiérrez Y Dña. María del Carmen Pérez Camino,** Directoras de la tesis y **Dña. M<sup>a</sup> Montaña Durán Barrantes,** Tutora, autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral “Biodisponibilidad de los componentes del insaponificable del aceite de oliva en humanos” Realizada por Dña. **Iman Kasem.**

Vº Bº Las Directoras

Fdo. Dra. Valentina Ruiz Gutiérrez      Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Carmen Pérez Camino

Vº Bº La Tutora

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Montaña Durán Barrantes

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de Nutrición y Metabolismo lipídico del Departamento de Caracterización y Calidad de los Alimentos del Instituto de la Grasa de Sevilla, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C), dentro del Programa Interdepartamental “Estudios Avanzados en Alimentos”, del que es responsable académico el Departamento de Ingeniería Química, el cual, de conformidad con el procedimiento establecido por su Consejo, ha autorizado su presentación en el día de la fecha.

Vº Bº El Coordinador del Programa      Vº Bº El Director del Departamento

Fdo. Dr. Fernando Romero Guzmán      Fdo. Dr. Francisco Carrillo de la Fuente

Sevilla, a      de Octubre de 2008

## AGRADECIMIENTO

Esta Tesis no se habría podido realizar sin la generosa colaboración de muchas personas a quienes deseo expresar mi agradecimiento:

A la prof. Dra. Dña Valentina Ruiz Gutiérrez responsable del grupo “Nutrición y Metabolismo Lipídico” y directora de este Trabajo. Quiero destacar la oportunidad de aprender y trabajar en su grupo, sus consejos científicos, sus conocimientos y todos los medios de que he dispuesto para la realización y elaboración de esta Tesis.

Un especial reconocimiento a la co-directora de esta Tesis Dra. Dña Maria del Carmen Pérez Camino, Jefa del Departamento de Caracterización y Calidad de Alimentos; un profundo agradecimiento a quien con su tiempo, ayuda, apoyo, paciencia y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad. Por esto y más .....Muchas gracias.

A la Dra. Dña M<sup>a</sup> Montaña Durán Barrantes tutora del trabajo y al Dr. D. Fernando Romero Guzmán coordinador del programa de “Estudios Avanzados en Alimentos” por sus consejos, interés y ayuda en facilitar todo para terminar este trabajo.

A D. José Luís Ríos Martín, quien al frente del espectro de masas me ayudó en la realización e interpretación de los espectros, por su constancia y empeño en el desarrollo de este trabajo, gracias por dedicarme su tiempo.

Igualmente esta Tesis no se hubiera realizado sin la ayuda y colaboración de los Doctores: D. José Luís Prada Paradal y D. Alfonso del Arco Jiménez del Hospital Costa del sol de Marbella.

A mi esposo Manuel, como un testimonio de gratitud ilimitada por su gran ayuda, comprensión y tolerancia. Con Mucho Cariño.

Agradezco a mis padres todo el apoyo recibido durante mi formación profesional. Con cariño y respeto.

A mi hijo Ahmad, porque su presencia ha sido y será siempre el motivo más grande que me ha impulsado a lograr esta meta.

A todas mis hermanas y hermanos por el apoyo que siempre me han brindado y con el cual he logrado terminar mi carrera profesional, siendo para mí, la mejor de las herencias.

Y por fin, a todos mis compañeros del grupo “Nutrición y Metabolismo Lipídico” Antonio, Rosana, Paco, Ana, Rosalía y Javier que de algún modo han puesto su interés en que este trabajo pudiera salir adelante. Gracias.

*Iman*

## I. INTRODUCCIÓN

<b>1. ACEITE DE OLIVA.....</b>	<b>1</b>
1.1. Aceites de oliva. Clasificación.....	1
1.2. Composición del aceite de oliva.....	2
1.3. Aceite de orujo de centrifugación. Obtención.....	3
1.3.1. Componentes menores insaponificables.....	5
1.3.1.1. Hidrocarburos.....	6
1.3.1.1.1 Hidrocarburos alifáticos.....	6
1.3.1.1.2. Hidrocarburos terpénicos.....	6
1.3.1.2. Compuestos alcohólicos.....	7
1.3.1.2.1. Alcoholes alifáticos.....	7
1.3.1.2.2. Alcoholes esteroideos.....	8
Esteroles. Fitosteroles. Colesterol.....	10
El colesterol.....	11
Dialcoholes Triterpénicos.....	13
1.3.1.2.3. Tocoferoles.....	14
1.4. Componentes menores insaponificables. Métodos de preparación..	15
<b>2. ACEITE DE OLIVA. EFECTOS BIOLÓGICOS.....</b>	<b>18</b>
2.1. Aceite de oliva y patología cardiovascular.....	18
2.2. Aceite de oliva y otras patologías.....	21
<b>3. METABOLISMO LIPIDICO.....</b>	<b>25</b>
3.1. Los lípidos. Importancia biológica.....	25
3.1.1. Ácidos grasos.....	25
3.1.2. Lípidos complejos.....	26
3.2. Absorción y metabolismo de los lípidos de la dieta.....	27
3.3 Transporte de los lípidos de la dieta. Las lipoproteínas.....	27
3.3.1. Estructura y composición de las lipoproteínas.....	28
3.4. Lipoproteínas Ricas en Triglicéridos.....	31

<b>4. METABOLISMO POSTPRANDIAL.....</b>	<b>32</b>
<b>5. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....</b>	<b>37</b>
5.1. Malnutrición en la infección por el virus del VIH/SIDA.....	37
5.1.1. Factores nutricionales y desarrollo de la infección.....	38
5.1.1.1. Efectos de la propia malnutrición.....	39
<b>6. ANORMALIDADES METABÓLICAS LIPIDICAS EN VIH.....</b>	<b>40</b>
6.1. Alteraciones en el metabolismo lipídico en enfermos de VIH.....	41
6.1.1. Citoquinas y cambios metabólicos.....	42
A) Aumento de la producción de VLDL.....	44
B) Descenso del aclaramiento plasmático de TRL.....	44
6.1.2. Fisiopatología de las alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas en el VIH.....	44
A) Producción de subclases de LDL de pequeño tamaño....	47
B) Elevada actividad de la enzima factor de activación plaquetaria-acetilhidrolasa.....	47
6.1.3. Dislipidemia.....	48
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>7. REACTIVOS, PATRONES Y MATERIALES EN GENERAL.....</b>	<b>51</b>
<b>8. MATERIA PRIMA.....</b>	<b>51</b>
8.1. Aceites.....	51
8.1.1. Composición en ácidos grasos.....	52
8.1.2. Fracción insaponificable.....	53
8.1.3. Ceras.....	58

<b>9. EXPERIENCIA CLÍNICA.....</b>	<b>60</b>
9.1. Selección y características de los voluntarios.....	60
1. Grupo de voluntarios sanos.....	60
2. Grupo de voluntarios infectados por VIH.....	61
9.2. Ingesta Experimental.....	62
9.3. Diseño Experimental.....	63
9.4. Extracciones.....	64
9.4.1. Extracción Basal.....	64
9.4.2. Ingesta de las comidas experimentales y extracciones durante el periodo postprandial.....	64
<b>10. SISTEMÁTICA ANALÍTICA DESARROLLADA PARA LA EVALUACIÓN DE COMPONENTES MENORES EN TRL.....</b>	<b>65</b>
10.1. Aislamiento de TRL.....	65
10.2. Extracciones de los lípidos de TRL. Método Folch.....	65
10.3. Obtención de la fracción de insaponificable de los lípidos procedentes de TRL.....	66
10.4. Procedimiento Cromatográfico.....	67
<b>11. IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES MENORES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS).....</b>	<b>68</b>
<b>12 LÍMITES DE DETECCIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>13. FACTORES DE RESPUESTA.....</b>	<b>69</b>
<b>14. RECUPERACIÓN Y REPETIBILIDAD.....</b>	<b>71</b>
<b>15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>71</b>



<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
<b>15. COMPOSICIÓN DE LA INGESTA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>73</b>
<b>16. COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES UTILIZADOS.....</b>	<b>73</b>
16.1. Composición en ácidos grasos.....	73
16.2. Componentes menores.....	75
<b>17. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA EL AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE COMPONENTES INSAPONIFICABLES EN LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS.....</b>	<b>78</b>
17.1. Aislamiento del insaponificable en TRL.....	78
17.2. Análisis mediante GC de las fracciones insaponificables.....	80
17.3. Identificación de componentes. Análisis de los espectros GC- MS.....	82
17.4. Límites de detección.....	91
17.5. Factores de respuesta.....	91
17.6. Recuperación y Repetibilidad de las diferentes familias de componentes del insaponificable.....	92
17.6.1. Resultados en TRL.....	92
17.6.2. Resultados en aceites.....	95
<b>18. BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPONENTES DEL INSAPONIFICABLE DEL ACEITE DE OLIVA DURANTE EL PERIODO POSTPANDRIAL EN VOLUNTARIOS SANOS Y ENFERMOS.....</b>	<b>97</b>
<b>18.1. Estudio de los componentes menores del insaponificable de         TRL de sujetos sanos.....</b>	<b>98</b>
18.1.1. Escualeno.....	98
18.1.2. Alcoholes alifáticos.....	100
18.1.3. Esteroles.....	107
18.1.3.1. Colesterol.....	107

18.1.3.2. Fitosteroles totales.....	110
18.1.3.3. Oxiesteroles.....	115
18.1.3.3.1. Sitostanetriol.....	116
18.1.3.3.2. 7-Cetocolesterol.....	118
18.1.3.3.3. Epoxicolesterol.....	119
<b>18.2. Estudio de los componentes menores del insaponificable de TRL de sujetos enfermos.....</b>	<b>122</b>
18.2.1. Escualeno.....	125
18.2.2. Alcoholes totales.....	125
18.2.3. Esteroles.....	127
18.2.3.1. Colesterol.....	127
18.2.3.2. Fitosteroles totales.....	128
18.2.3.3. Oxiesteroles.....	129
18.2.3.3.1. Sitostanetriol.....	130
18.2.3.3.2. 7-Cetocolesterol.....	132
18.2.3.3.3. Colest-5-en-24one.....	133
18.2.3.3.4. Colest-7en-3ol.....	134
18.2.3.3.5. Epoxicolesterol.....	134
<b>18.3. Estudio comparativo de los componentes menores del insaponificables entre sujetos sanos y enfermos de TRL.....</b>	<b>138</b>
18.3.1. Escualeno.....	138
18.3.2. Alcoholes totales.....	140
18.3.3. Esteroles.....	142
18.3.3.1. Colesterol.....	142
18.3.3.2. Fitosteroles totales.....	144
18.3.3.3. Oxiesteroles.....	147
18.3.3.3.1. Sitostanetriol.....	148
18.3.3.3.2. Epoxicolesterol.....	150
18.3.3.3.3. 7-Cetocolesterol.....	152

V. CONCLUSIONES.....	157
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	159
VII. ABREVIATURAS.....	183

## 1. ACEITE DE OLIVA

### 1.1. Aceites de oliva. Clasificación

El aceite de oliva es de los pocos productos, si no el único, que goza de una normativa, bien establecida en el ámbito comunitario, que regula los parámetros y metodología a seguir a la hora de valorar las cualidades químicas y sensoriales que categorizarán la calidad del producto. Actualmente se rige por el reglamento comunitario de 1991 (EEC, 1991).

Según esta Normativa, se denomina Aceite de oliva virgen al obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos en condiciones, sobre todo térmicas, que no impliquen la alteración del aceite y no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, decantación, el centrifugado y la filtración, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolventes o por procedimientos de reesterificación y toda mezcla con aceites de otra naturaleza.

Dichos aceites son el objeto de la clasificación y de las denominaciones sintetizadas en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Actuales categorías de los aceites de oliva virgen

Aceite de Oliva Virgen Extra	Acidez libre, expresada como ácido oleico, $\leq 0,8\%$ , siendo la mediana de sus defectos 0, y la del atributo frutado superior a 0.
Aceite de Oliva Virgen	Acidez libre $\leq 2\%$ , siendo la mediana de sus defectos inferior o igual a 2,5 y la del atributo frutado superior a 0.
Aceite de Oliva Lampante	Acidez libre $>2\%$ , siendo la mediana de sus defectos superior a 2,5 y la del atributo frutado superior a 0.

Existen otras categorías inferiores de aceites de oliva y cuyas definiciones están sintetizadas en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Aceites de oliva y Orujo de oliva

Aceite de oliva refinado*	Obtenido mediante la refinación de aceites de oliva vírgenes. Acidez < 0,3%.
Aceite de oliva	Mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del aceite lampante. Acidez ≤ 1%.
Aceite de orujo de oliva crudo*	Obtenido a partir del orujo de oliva mediante tratamiento con disolvente o por medios físicos.
Aceite de orujo de oliva refinado*	Obtenido mediante refinación de aceite de orujo crudo. Acidez ≤ 0,3%.
Aceite de orujo de oliva	Mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del lampante. Acidez ≤ 1%.

\*Estas categorías no se comercializan

## 1.2. Composición del aceite de oliva.

El aceite de oliva está compuesto, como todos los aceites comestibles, en su mayoría por triglicéridos (glicerol esterificado con ácidos grasos), en lo que se denomina **Fracción Saponificable** 97-99%. La abundancia de ácido oleico es característica del aceite de oliva y su porcentaje, respecto al total de AG de TG, varía del 60-80%. Sin embargo, el ácido linoleico, el principal ácido graso esencial y es un PUFA, está presente en concentraciones del 3-21%. Asimismo, contiene una fracción minoritaria 1-3%, denominada **Fracción Insaponificable**, compuesta de una serie muy diversa y compleja de sustancias, de interés tanto nutricional como de valor sensorial que le confiere a los aceites un papel funcional relevante (Mataix et al., 2000). Los componentes de la fracción insaponificable por orden creciente de polaridad son: hidrocarburos,

tocoferoles, alcoholes grasos, alcoholes triterpénicos, 4- $\alpha$ -metil-esteroles, esteroides, dialcoholes triterpénicos, y pigmentos coloreados polares (clorofilas y feofitinas), (Ruiz-Gutiérrez et al., 2000).

### **1.3. Aceite de orujo de centrifugación. Obtención**

Los sistemas de elaboración de aceite de oliva virgen han evolucionado en los últimos años hacia producciones menos agresivas con el medio ambiente y más cuidadosas con el consumo de agua potable. Se ha implantado el sistema en continuo denominado “ecológico” o “de dos fases”. Mediante este sistema no se emplea prácticamente agua y da como resultado dos fracciones: una líquida, el aceite de oliva virgen y otra una pasta fluida, el alperujo. Este alperujo, contiene la mayor parte de los sólidos que se encuentran en la aceituna, como la piel, pulpa, hueso y almendra, además de una cantidad variable de aceite y agua. La cantidad de aceite que contiene el alperujo es considerable, y se vio la posibilidad de volverlos a extraer (Alba-Mendoza et al., 1996) (Figura 1).

Así ahora, el alperujo se somete a una segunda centrifugación, proceso que se realiza sin el empleo de temperaturas elevadas, al no llevarse a cabo un secado y, del mismo modo, el empleo de disolventes, lo cual incrementa la calidad del aceite, minimizando de ese modo la formación de productos nocivos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Sánchez-Moral y Ruiz-Méndez, 2006). Las características de este nuevo sistema conlleva un aumento de los parámetros de calidad y pureza del aceite, así como una menor pérdida de compuestos biológicamente activos. La aplicación de este novedoso proceso de extracción han sido objeto de patente (Artacho, 1999) y representa una mejora en el rendimiento de producción del orujo, tanto para la obtención de un aceite de mayor calidad, como para un aumento en el aprovechamiento de los residuos del olivo en términos de aplicación como combustible, enriquecimiento de suelos, e incluso para pienso de animales.

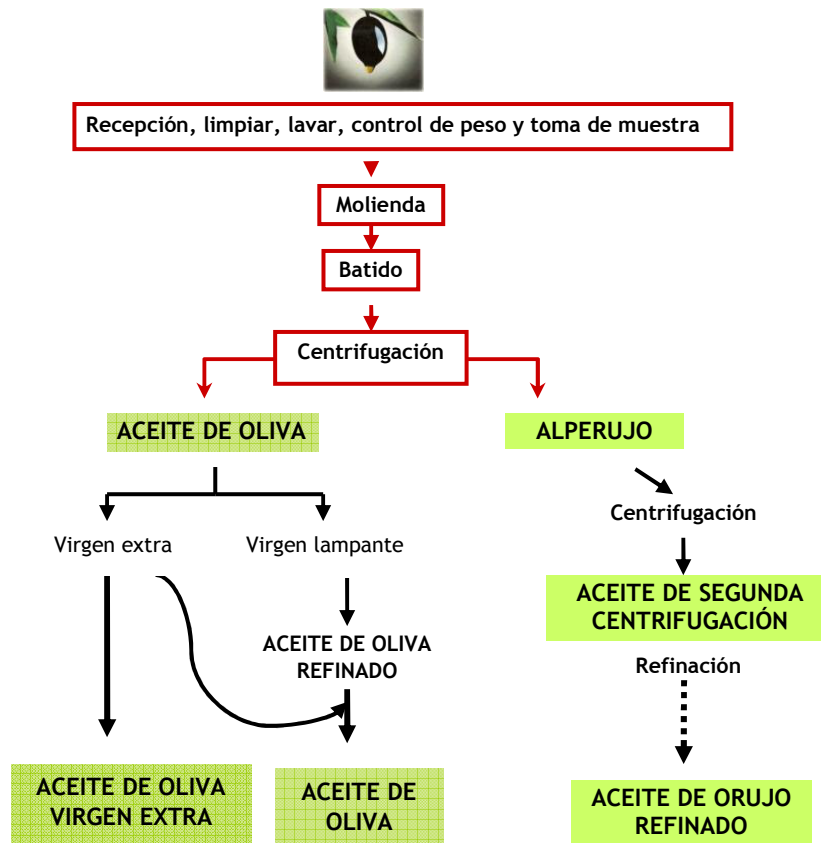


Figura 1. Sistema de centrifugación en 2 fases

El aceite de segunda centrifugación, puede poseer características que lo hacen no apto para consumirlo directamente, por lo que debe ser sometido a un proceso de refinación, similar al de los aceites de oliva lampantes, haciéndolo adecuado para su uso en alimentación humana. Con este proceso de refinación se pretende eliminar todos los componentes no deseados que puedan afectar a las propiedades sensoriales y a la estabilidad de aceite. Por tanto, el aceite de orujo de oliva que se utiliza normalmente para el consumo directo es un aceite que ha sido refinado por procedimientos químicos y posteriormente para su consumo es encabezado con aceite de oliva virgen.

La composición de este aceite es similar a la del aceite de oliva virgen y está formado por una fracción saponificable, que constituye el 97-99% del total, y una fracción insaponificable, formada por los mismos constituyentes aunque difieren en sus cantidades.

Es precisamente esta fracción, por su amplia distribución en el mundo vegetal y la gran variedad de efectos biológicos que se atribuyen a estos compuestos naturales y a sus derivados (Moreau et al., 2002), la que será objeto de nuestro trabajo.

### **1.3.1. Componentes menores insaponificables**

Los componentes menores insaponificables de los aceites forman un conjunto de lípidos que no sufren hidrólisis alcalina y que por tanto se pueden aislar tras un proceso de saponificación del aceite con un hidróxido alcalino y posterior extracción con un disolvente orgánico (hexano o éter etílico). Este grupo de compuestos además de participar en el mantenimiento de la estabilidad de la propia grasa donde se encuentran, evitando su enranciamiento y otras alteraciones así como contribuir a determinadas propiedades sensoriales, tienen otras funciones en mayor o menor medida conocidas en el organismo como por ejemplo la actividad vitamínica de los tocoferoles, o como la presentada por los fitosteroles al competir con el colesterol en la absorción intestinal (Valsta et al., 2004; Andersson et al., 2004).

Esta fracción insaponificable está constituida por: hidrocarburos (escualeno), alcoholes lineales, terpénicos y esteroideos entre los que se incluyen los fitosteroles en general y entre estos el  $\beta$ -sitosterol en particular.

#### **1.3.1.1. Hidrocarburos**

Los hidrocarburos en los aceites de oliva constituyen el 32-50% del material insaponificable. Se podrían clasificar de muy diversas maneras,



una de ellas es, como se recoge en el Cuadro 3, de acuerdo a su estructura, en alifáticos y ramificados.

**Cuadro 3.** Principales hidrocarburos presentes en los aceites de oliva

GRUPO	COMPUESTO	FUNCIÓN
Hidrocarburos	Alifáticos: Alcanos (C <sub>11</sub> -C <sub>35</sub> ) y alquenos monoinsaturados	Impermeabilizantes
	Ramificados o Terpénicos: Esqualeno y Caroteno	Intermediarios en la síntesis de esteroides

#### 1.3.1.1.1 Hidrocarburos alifáticos

Están formados generalmente por 11 a 35 átomos de carbono organizados linealmente. Se encuentran en mayores concentraciones junto a los lípidos extracelulares epicuticulares en plantas superiores y tienen una función impermeabilizante, protegiendo de diferentes formas de estrés. En menores concentraciones también forman parte de los lípidos intracelulares en plantas e incluso en los mamíferos. Los encontramos en aceites vegetales en una concentración entre 7 y 170 mg/kg (Lanzón et al., 1994).

#### 1.3.1.1.2. Hidrocarburos terpénicos. Escualeno

Denominados también isoprenoides, debido a que el isopreno (unidad de 5 átomos de carbono) es su precursor biológico; todos derivan de la fusión repetida de unidades ramificadas de estos cinco carbonos. Podemos encontrar compuestos que contienen desde una hasta ocho unidades. Las unidades pueden disponerse linealmente, como en el caso del escualeno, o cíclicamente como en el caso de los *carotenoides* que son tetraterpenos muy importantes en los mamíferos, especialmente el  $\beta$ -caroteno que es precursor de la vitamina A.

En los aceites de oliva el hidrocarburo más abundante es el escualeno, hidrocarburo triterpénico con seis dobles enlaces conjugados. Constituye un intermediario en la biosíntesis de esteroides, tanto de fitosteroides en plantas como de colesterol en animales. Es también un componente mayoritario de los lípidos de la piel en humanos donde ejerce un efecto quimioprotector (Waterman y Lockwood, 2007; Newmark, 1997). Diferentes autores han hablado del efecto potencial del escualeno como antioxidante (Malecka, 1991) y como protector de regeneración nerviosa (Aguilera et al., 2005). Por otra parte, este hidrocarburo es un potente inhibidor de la enzima que cataliza la síntesis de colesterol 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima, por lo que podría desempeñar un papel importante en procesos aterogénicos (Bellosta et al., 2000).

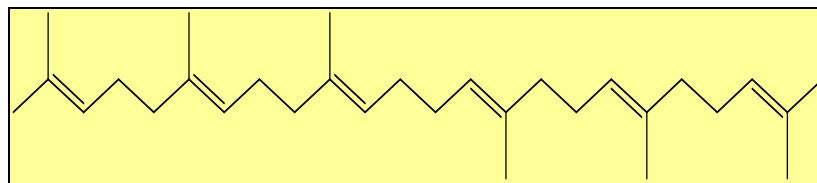


Figura 2. Representación de la molécula del escualeno

### 1.3.1.2. Compuestos alcohólicos

En los aceites los componentes menores de naturaleza alcohólica se presentan tanto en forma libre como esterificados con ácidos grasos formando lo que se denominan ceras (Hargrove et al., 2004).

#### 1.3.1.2.1. Alcoholes alifáticos

Los alcoholes primarios de cadena lineal se encuentran formando parte de la fracción lipídica de numerosas materias biológicas. (Moreda et al., 2004). En la mayoría de las plantas, esta fracción está constituida por una serie saturada de 20 a 28 átomos de carbono, siendo los miembros más abundantes los de cadena par y concretamente los de 24 y 26 átomos de

carbono. Dado que los ácidos mayoritarios tienen 18 átomos de Carbono (esteárico, oleico, linoleico y linolénico), al esterificarse con un alcohol resultan ceras que tienen 42 y 44 átomos de Carbono (Kunst et al, 2002). También están presentes en los aceites, aunque en mucha menor proporción, su serie homóloga monoinsaturada (C23, C25, C27 y C29). Hay diferentes estudios donde se ha demostrado que los policosanoles son capaces de disminuir el colesterol y por tanto reducir los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Menéndez et al., 2005; Gámez et al., 2005; Chen et al., 2005; Castano et al., 2004; Hargrove et al., 2004; Janikula et al., 2002; McCarty, 2002).

En los aceites de oliva virgen los alcoholes alifáticos se encuentran entre 100-200 mg/kg, mientras que en los orujos esta cantidad es la mínima presente.

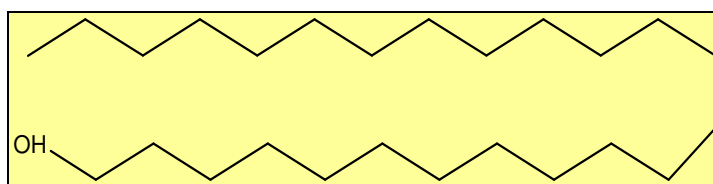


Figura 3. Estructura general de un Alcohol lineal o alcanol de C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>O (Hexacosanol)

#### 1.3.1.2.2. Alcoholes esteroideos

Alcoholes esteroideos es el nombre genérico dado a un amplio grupo de compuestos triterpénicos tetra y penta-cíclicos que contienen un grupo hidroxilo en el C-3 (Figura 5). Podemos dividirlos a su vez en tres grupos

1. 4,4'-Dimetilesteroles, o **alcoholes triterpénicos** propiamente.
2. 4-Monometilesteroles, también conocidos por **metilesteroles**
3. 4-Desmetilesteroles, también denominados **esteroles** normales, los más comunes de este grupo son: Colesterol en animales y β-Sitosterol en vegetales.

Los alcoholes esteroideos son sintetizados a partir del acetyl-CoA vía ácido mevalónico siendo el escualeno un intermediario clave, y fundamental que al ciclar produce cicloartenol en plantas y lanosterol en animales. Al igual que los alcoholes lineales los esteroideos se presentan libres y esterificados en forma de ceras (esterólicas y triterpénicas).

En la figura 4, se recoge un esquema de la biosíntesis de alcoholes esteroideos, con la formación en primer lugar de alcoholes triterpénicos, metil esteroides y por último, esteroides.

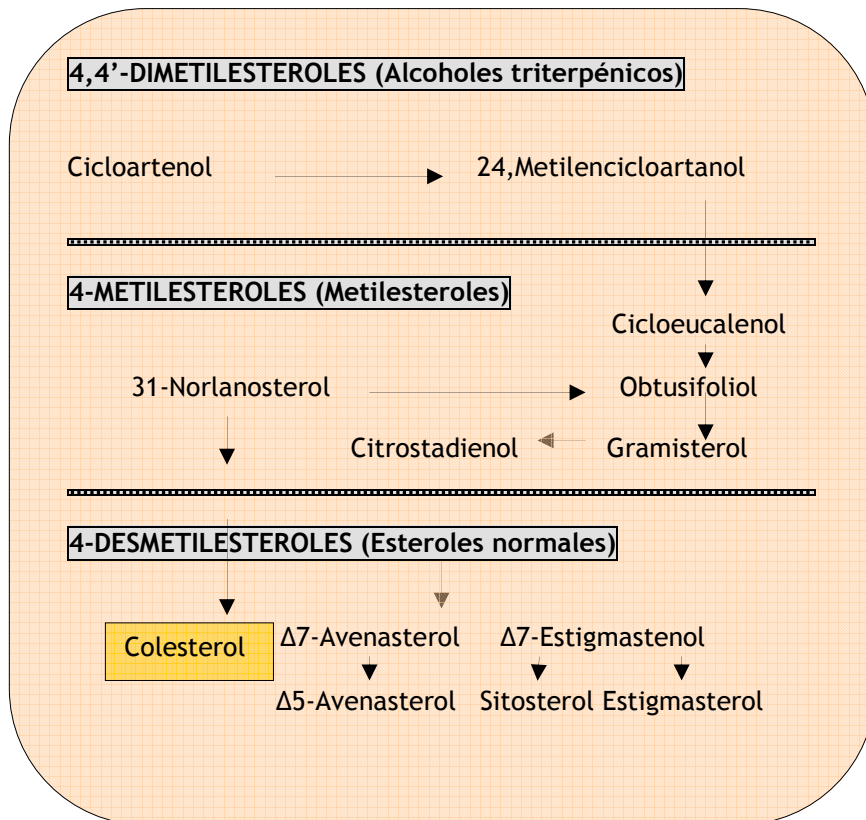


Figura 4. Esquema General de la Biosíntesis de alcoholes esteroideos

**Esteroles. Fitosteroles. Colesterol** Todos se pueden denominar genéricamente alcoholes esteroideos. Zooesteroles se denominan cuando el origen es animal, siendo el colesterol el más abundante de este grupo, y fitosteroles cuando el origen es vegetal, siendo en este último caso el  $\beta$ -Sitosterol el más abundante seguido del campesterol y estigmasterol.

En esencia, los esteroles se diferencian de los alcoholes triterpénicos propiamente dicho en no poseer ningún grupo metileno en las posiciones 4 y 4'.

A pesar de su similar estructura química, esteroles vegetales y animales difieren enormemente en relación a sus propiedades farmacológicas. El colesterol se asocia a enfermedades coronarias y los esteroles de plantas a la de inhibidores de la absorción de colesterol, anti-inflamatorio, anti-microbiano, anti-bacteriano, anti-fúngico y antioxidantes (Awad, 2000; Muti et al., 2003; Tapiero et al., 2003; Ovesna et al., 2004; Varady et al., 2004; Moreno, 2003).

Los posibles mecanismos por los que los esteroles vegetales reducen la concentración plasmática de colesterol incluyen:

- 1) Inhibición de la absorción de colesterol en el intestino delgado a través del desplazamiento del colesterol de las micelas.
- 2) Limitando la solubilidad intestinal del colesterol.
- 3) Disminución la hidrólisis de los ésteres de colesterol en el intestino delgado (Ling y Jones, 1995).

En la figura 5, se recogen las principales estructuras esterólicas encontradas. Se ha dividido en dos grupos denominados “Estructuras  $\Delta 5$ ” y “Estructuras  $\Delta 7$ ” que difieren en la posición del doble enlace en el anillo B, entre  $C_5-C_6$  en los  $\Delta 5$ , y entre  $C_7-C_8$  para los  $\Delta 7$ .

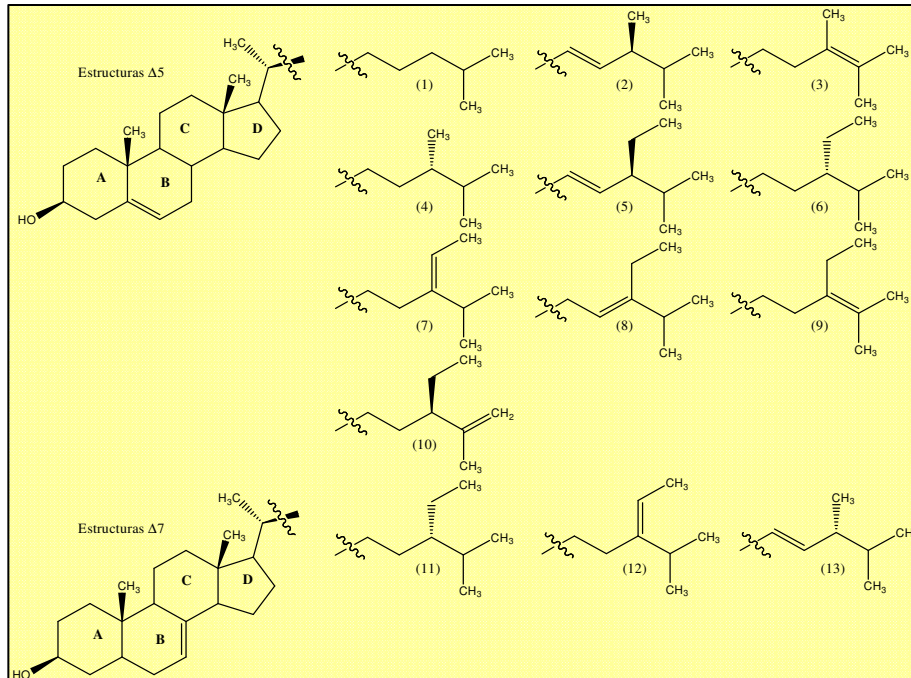


Figura 5. Estructura de los principales Esteroles

(1) Colesterol (colest-5-en-3 $\beta$ -ol). (2) Brasicasterol (24[S]-24-metilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol). (3) 24-Metilcoolesterol (24-metilcolest-5,24-dien-3 $\beta$ -ol). (4) Campesterol (24[R]-24-metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol). (5) Estigmasterol (24[S]-24-etilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol). (6)  $\beta$ -Sitosterol (24[R]-24-etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol). (7)  $\Delta^5$ -Avenasterol (24[Z]-24-etilidencolest-5-en-3 $\beta$ -ol). (8)  $\Delta^5,23$ -Estigmastadienol (24-etilcolest-5,23-dien-3 $\beta$ -ol). (9)  $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol (24-etilcolest-5,24-dien-3 $\beta$ -ol). (10) Clerosterol. (24[S]-24-etilcolest-5,25-dien-3 $\beta$ -ol). (11)  $\Delta^7$ -Estigmastenol (24[R]-24-etil-5 $\alpha$ -colest-7-en-3 $\beta$ -ol). (12)  $\Delta^7$ -Avenasterol (24[Z]-24-etiliden-5 $\alpha$ -colest-7-en-3 $\beta$ -ol). (13)  $\Delta$ -Espinasterol (24[R]-24-etil-5 $\alpha$ -colest-7,22-dien-3 $\beta$ -ol).

**El colesterol** es un alcohol esteroideo que consta de cuatro anillos fusionados, una cadena lateral unida al C<sub>17</sub> del anillo D, un grupo hidroxilo unido al C<sub>3</sub> del anillo A, y un doble enlace entre C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub> del anillo B, se trata por tanto, de una estructura  $\Delta^5$ . Es el esteroide más abundante en los animales, pertenece a este grupo por tener el mismo esqueleto caracterizado por la presencia de un hidroxilo (OH) en el C<sub>3</sub> y su cadena lateral alifática de 8 átomos de carbono. Es un componente mayoritario de las membranas plasmáticas animales. El grupo OH en la molécula, le da un

débil carácter anfífilo y el núcleo esteroide, es una estructura no polar, rígida y plana, por lo tanto, esto es un determinante importante de las propiedades de la membrana. Forma parte estructural de ellas a las que confiere estabilidad. El colesterol es un componente graso esencial para la vida. En la dieta se halla exclusivamente en los alimentos de origen animal como por ejemplo yema de huevo, carnes, productos lácteos, mantequilla, órganos (como el hígado). Este esteroide, es abundante también en lipoproteínas del plasma sanguíneo, en donde aproximadamente el 70% está esterificado por ácidos grasos de cadena larga formando ésteres de colesterol. Es el precursor metabólico de las hormonas esteroideas, que son sustancias que regulan una gran variedad de funciones fisiológicas, que incluyen el desarrollo sexual y el metabolismo de los carbohidratos. Es por tanto, molécula base que sirve para la síntesis de casi todos los esteroides, así como de ácidos biliares, precursores de sales biliares necesarias para la solubilización y posterior absorción grasas. Circula permanentemente en el cuerpo humano entre el hígado, donde se secreta y se almacena, y los demás tejidos del organismo; sin embargo, como no se disuelve en soluciones acuosas, como el suero, para ser transportado necesita integrarse a otras sustancias solubles, las lipoproteínas.

En contraste con el colesterol, los fitosteroles se absorben en muy pequeña proporción entre 0 y 10%, dependiendo del esteroide vegetal concreto (Ling, 1995). Por otra parte, su presencia interfiere con la incorporación del colesterol en las micelas intestinales, lo que contribuye a disminuir su absorción (Jones et al., 2001; Lichtenstein et al., 2001).

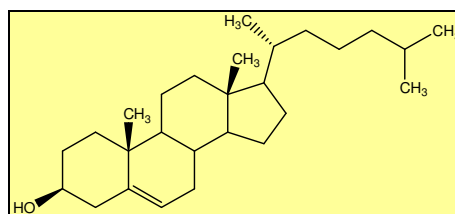
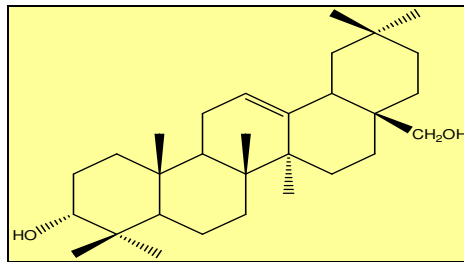


Figura 6. Molécula del colesterol

### **Dialcoholes Triterpénicos**

**Eritrodiol** (3 $\beta$ -olean-12-en-28-diol) es un dialcohol triterpénico muy característico del aceite de orujo. Va acompañado de otro diol triterpénico pentacíclico, el uvaol ( $\Delta$ -12-ursen-3 $\beta$ , 28-diol) (Akasbi et al., 1993). Ambos compuestos se encuentran en mayor proporción en la piel del fruto y, de ahí su importante presencia en los aceites de orujo. Su concentración varía de 10 a 12 mg/kg de aceite de oliva virgen (Paganuzzi, 1979; Mariani et al., 1987).



**Figura 7.** Estructura del Eritrodiol, principal dialcohol triterpénicos en los aceites de oliva y orujo

Los dialcoholes pentacíclicos han demostrado tener gran importancia en terapias antiinflamatorias, debido a que su estructura es similar a los corticoides (De la Puerta et al, 2000). También han sido descritos como citoestáticos, citotóxicos y antimicrobianos (Esuoso et al., 2000); se ha demostrado que poseen un efecto vaso-relajante en la aorta de las ratas de experimentación y una función estimuladora de NO a nivel de la capa endotelial arterial, a la vez que un descenso de las células secretoras de calcio en la musculatura lisa de dichos vasos con la consecuente relajación arterial, también contribuyen a la homeostasis vascular al inducir la liberación de PGI<sub>2</sub>, y ser de esta forma una molécula bioactiva que puede contribuir a los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea (Rodríguez-



Rodríguez et al., 2004; Rodríguez-Rodríguez et al., 2008; Martínez-González et al., 2008).

#### **1.3.1.2.3. Tocoferoles.**

Entre la fracción insaponificable del aceite de oliva se encuentra la familia de compuestos antioxidante los tocoferoles. La molécula de tocoferol presenta dos partes diferentes: una cíclica denominada anillo cromano, y una cadena isoprenoide, cadena fitilo, en el carbono 2 que le permite su incorporación y retención en las membranas celulares, hasta 1 molécula por cada 2000 moléculas de fosfolípidos. Se presentan como cuatro formas activas diferentes:  $\alpha$  (Alfa),  $\beta$  (Beta),  $\gamma$  (Gamma) y  $\delta$  (Delta), que se diferencian entre sí en los grupos metilo en la molécula fenólica del anillo cromano.

Destacan por ser potentes antioxidantes como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). La presencia de suplementos de vitamina E en la dieta generalmente en combinación con otras vitaminas antioxidantes, se ha relacionado con una menor mortalidad por enfermedad cardiovascular (Duthie y Bellizzi, 1999). Dichos efectos beneficiosos han sido asociados tanto al potencial antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol sobre la peroxidación lipídica (Azzi et al., 2003), como a la modulación del metabolismo de eicosanoides (Jialal et al., 2001) o de la activación endotelial (Zapolska-Downar et al., 2000). Sin embargo, debido a los controvertidos resultados de ensayos clínicos, enfocados sobre los efectos de las vitaminas antioxidantes en la enfermedad coronaria, actualmente se considera que no existe evidencia científica suficiente para recomendar la suplementación con vitamina E (Rimm y Stampfer, 2000; Kris-Etherton et al., 2004). Los decepcionantes resultados de dichos estudios clínicos podrían ser explicados, en parte, por las diferencias, respecto a la ingesta habitual, de esta vitamina en la vida cotidiana.

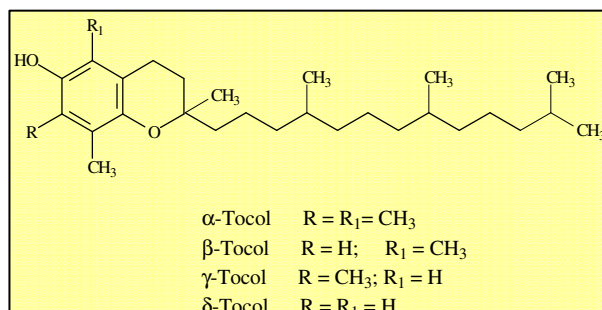


Figura 8. Estructura de tocoferoles

#### 1.4. Componentes menores insaponificables. Métodos de preparación

Durante años se ha realizado un considerable esfuerzo en desarrollar métodos rápidos de análisis de los componentes menores del insaponificable en aceites y grasas. Cuando es requerida la cantidad total todos los procedimientos comienzan eliminando la parte glicerídica saponificando la muestra. La saponificación consiste en transformar los compuestos glicerídicos y los ésteres grasos en jabones mediante calentamiento con una solución alcalina en etanol. A continuación se adiciona agua y se extrae con un disolvente orgánico, normalmente éter. Posteriormente, se lava y se evapora. El residuo obtenido es el insaponificable, dejando esta fracción lista para poder determinar en ella los compuestos que nos interesen, pero previamente es necesario un aislamiento en grupos o familias de compuestos debido a las posibles interferencias entre ellos en su posterior determinación cuantitativa. El fraccionamiento se realiza mediante diferentes técnicas: cromatografía en capa fina (CCF), extracción en fase sólida con cartuchos de sílice (Si-SPE), HPLC, etc. El último paso es el análisis de las fracciones aisladas, generalmente, mediante cromatografía de gases (GC) usando una columna de fase no polar.

En general, todos los métodos para cuantificar los componentes del insaponificable están basados en la preparación del insaponificable, el fraccionamiento y por último el análisis de cada fracción mediante alguna técnica cromatográfica (Cert et al., 2002; Plat et al., 2001; Phillips et al., 1999; Amelio et al., 1992).

Los aceites y grasas pueden ser directamente saponificados, sin embargo, las muestras de alimentos o los lípidos de material biológico requieren la extracción de la fracción lipídica previamente a la saponificación. Los métodos más generales usados para la extracción de lípidos y posterior obtención del material insaponificable, son el método oficial de la AOAC (Cunniff, 1999) y el método de Folch o alguna de sus variaciones (Folch et al., 1957).

Una saponificación directa de la muestra también se ha utilizado en ocasiones y tiene la ventaja del ahorro de tiempo, por ejemplo se usa en alguna determinación muy específica como la cuantificación de colesterol en alimentos. Para la determinación de compuestos que no se afectan por la saponificación, como es el caso de los hidrocarburos o compuestos que no se encuentran normalmente esterificados como los tocoferoles, el paso de la saponificación puede ser evitado y los compuestos determinados directamente.

A continuación se detallan, en el cuadro 4 todos los procedimientos para la obtención del insaponificable.

**Cuadro 4. Métodos para obtener el insaponificable**

1. Insaponificable al éter etílico (IUPAC 2401/1992; EEC 2568/91)
2. Método del hexano (IUPAC 2401, 1992).
3. Saponificación suave (Moreda et al., 2004).
4. Método del óxido de aluminio (ISO 12228,1999).
5. Transmetilación (Plank et al., 1993; Biedermann et al., 1993).
6. Método del tetrametil-amonio (Moreda et al., 2004).

Una vez obtenida la materia insaponificable suele ser necesario su fraccionamiento mediante alguna de las técnicas que se recogen en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Técnicas de separación

1. Cromatografía en capa fina
2. Cromatografía en columna (Moreda et al., 2004).
3. Extracción en fase sólida (Amelio et al., 1992).
4. Cromatografía líquida de alta Resolución (Cert et al., 1997).
5. Extracción con fluidos supercríticos (Lesellier et al., 2001)
6. En-Linea Cromatografía líquida - cromatografía gaseosa (HPLC-HRGC) (Señorans et al., 1998; Grob et al., 1992; Gallina-Toschi et al., 1996; Plank et al., 1994; Artho et al., 1993; Villen et al., 1998).

## **2. ACEITE DE OLIVA. EFECTOS BIOLÓGICOS**

Desde que se iniciaran los primeros estudios de los efectos beneficiosos del aceite de oliva sobre la patología cardiovascular, han ido apareciendo otros estudios en otros campos de la patología humana no menos importantes que el anterior por la alta incidencia de su aparición así como por el alto índice de mortalidad que causan. Entre estas patologías podemos destacar las enfermedades tumorales, las autoinmunes y en general la patología inflamatoria que está en la base de múltiples desarrollos patológicos. Analizaremos brevemente lo más destacado de cada una de ellas y la situación de las actuales líneas de investigación.

### **2.1. Aceite de oliva y patología cardiovascular**

Los estudios relativos al beneficio del aceite de oliva en la patología vascular se remonta varias décadas con los trabajos del profesor Keys (Keys, 1986) los cuales demostraron que la presencia de ácidos grasos insaturados en la dieta mediterránea disminuye el riesgo de padecer obstrucciones en las arterias del corazón. También se puso de relieve en dichos trabajos la relación directa entre los niveles de colesterol en sangre y la incidencia de infarto de miocardio, así como entre la cantidad de grasas saturadas y los niveles de colesterol.

Desde entonces se han llevado a cabo numerosas investigaciones en este sentido cuyos resultados han podido concluir que los ácidos grasos monoinsaturados incrementan la proporción entre el colesterol HDL y el LDL. También se descubrió que el colesterol HDL tiene un marcado efecto protector frente a la acumulación de placas de ateroma en las paredes de las arterias. A diferencia del aceite de oliva, los aceites de semillas (soja, girasol, etc.) poseen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y pocos monoinsaturados lo que les hace ser menos beneficiosos a la hora de proteger las paredes vasculares. Aunque hacen descender el colesterol total en sangre, no aumentan la proporción de colesterol HDL frente al

LDL, pues según los últimos estudios el riesgo de padecer placas de aterosclerosis vendría determinado más que por el aumento total de colesterol en sangre, por la proporción HDL vs. LDL, careciendo por tanto del mismo efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares que el aceite de oliva.

Muchos de los trabajos publicados hacen hincapié en que las propiedades beneficiosas de los aceites de oliva descritas a nivel cardiovascular se atribuyen a su característica composición en ácidos grasos. El aceite de oliva presenta un elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados (**AGMI**), siendo mayoritario el ácido oleico (18:1, n-9), que se halla en un 56-84 % (Boskou, 1998). Por otra parte, contiene cantidades apreciables de los ácidos palmítico (16:0) y linoleico (18:2, n-6). En menores proporciones se hallan los ácidos esteárico (18:0), mirístico (14:0), aráquico (20:0) y  $\alpha$ -linolénico (18:3, n-3) (Boskou, 1998).

Los ácidos grasos, como componentes de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de la membrana celular, desempeñan un papel crucial en la estructura y mantenimiento de la integridad celular. La diferente disposición espacial de los ácidos grasos en la membrana celular, dependiendo de que sean mono o poliinsaturados, determinan cambios funcionales a nivel de la misma, ya que mientras los ácidos grasos de carácter saturado (**AGS**) se disponen en la bicapa lipídica de una manera muy empaquetada formando una estructura con muy poco movimiento, los ácidos grasos insaturados ocupan más espacio y son más móviles, es decir, la fluidez de la membrana es mayor aumentando consecuentemente su permeabilidad. Una proporción relativamente elevada de ácidos grasos insaturados, y especialmente, poliinsaturados de cadena larga, parece ser necesaria para una correcta fluidez y funcionalidad de la membrana modulando importantes procesos celulares (Mataix, 2002; Harwood y Yaqoob, 2002). Sin embargo, el principal problema de los ácidos grasos poliinsaturados (**AGPI**) es que conllevan un elevado riesgo de peroxidación lipídica de las membranas (Parthasarathy et al., 1990). El proceso

oxidativo se lleva a cabo por reacciones en cadena que van destruyendo los ácidos grasos poliinsaturados alterando profundamente la estructura y función de la membrana. Por tanto, la ingesta de ácidos grasos de menor grado de insaturación, como el ácido oleico, representa una mejor alternativa de cara a la propia alteración lipídica.

Existen otros hechos biológicos que pueden ser modulados por la ingesta de una dieta rica en aceite de oliva y que están relacionados con la patología aterosclerótica. Dos de estos eventos son: la modificación del perfil lipídico y la protección frente a la oxidación de las LDL. La capacidad para modular dichos acontecimientos varía en función del tipo de ácido graso de la dieta que se considere, saturado o insaturado.

En cuanto a la modificación del perfil lipídico, y en el caso concreto de los **AGMI**, cuyo principal representante es el ácido oleico, múltiples investigaciones han demostrado los efectos beneficiosos de una dieta rica en este tipo de ácidos grasos sobre los niveles de colesterol, mediante un descenso de las LDL en plasma, así como un mantenimiento o incluso un aumento de las HDL plasmáticas, con la consiguiente reducción del riesgo de enfermedad coronaria frente a una dieta rica en grasas saturadas o en carbohidratos (Grundey, 1986; Williams et al., 1999; Moreno y Mitjavila, 2003). Igualmente, el aporte de AGMI en la dieta mediante el consumo de aceite de oliva, ha sido asociado a una mejora en el metabolismo postprandial de triglicéridos (Abia et al., 1999).

En cuanto a la protección del daño oxidativo sobre las LDL, Bonanome et al., 1992b, compararon el efecto de la ingesta de aceite de oliva en la dieta (rico en el AGMI ácido oleico) con otra dieta rica en AGPI sobre la oxidación de las LDL, y al final del estudio se observó que el rango de oxidación de las LDL *ex vivo* era mucho menor en el grupo alimentado con la dieta rica en ácido oleico. Estudios posteriores han corroborado estos resultados, demostrándose que las LDL de sujetos alimentados con dietas enriquecidas en aceite de oliva son menos susceptibles a la oxidación frente a las procedentes de sujetos alimentados con una dieta

basal (Aviram y Eias, 1993), una dieta rica en AGPI (Reaven et al., 1993, Kratz et al., 2002), o incluso rica en hidratos de carbono (Berry et al., 1992). Estos resultados indican el papel protector de la presencia de AGMI en la dieta frente a uno de los principales eventos desencadenantes de la aterosclerosis.

Además de los efectos benéficos atribuidos al ácido oleico, hasta ahora vistos, es de señalar que los fenoles contenidos en el aceite de oliva han demostrado ser beneficiosos para el corazón, beneficios que se pierden en el proceso de refinación. Los fenoles configuran un grupo importante de compuestos bioquímicos que abarca a flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y vitaminas; la mayoría de ellos ostentan un gran papel antiinflamatorio similar al del ibuprofeno (Ruano et al., 2005).

## **2.2. Aceite de oliva y otras patologías**

Gracias a los estudios epidemiológicos se pudo poner de manifiesto la diferente incidencia de determinados tipos de cáncer en diferentes regiones, resultados que fueron achacados a la diferencia de dietas y, en general, se ha podido también demostrar una correlación entre cáncer y grasas, como han demostrado diferentes estudios científicos publicados desde 1997 (Kushi y Giovannucci, 2002; Owen et al., 2004; Trichopoulou et al., 2000; Sieri et al., 2004; Rose, 1997; Holmes et al., 1999; Bartsch et al., 1999).

Según el oncólogo Ramón Colomer, “el 80% de los cáncer se debe a motivos no genéticos y a hábitos de salud como la dieta, cuyo papel preventivo en la evolución de la enfermedad puede ser tanto o más importante que los propios fármacos antitumorales, como el tamoxifeno, en el caso de los tumores mamarios”.

Las poblaciones con una dieta rica en aceite de oliva muestran una menor incidencia de cánceres gastrointestinales, de mama o próstata, existiendo indicios de que una alimentación con aceite de oliva puede



reducir un 8-10% el cáncer de colon. Dicha relación entre alimentación y cáncer está determinada por el tipo de ácido graso de la dieta. Así, recientemente, las propiedades anticancerígenas del aceite de oliva han sido asociadas a un efecto regulador inducido por el ácido oleico sobre varios oncogenes implicados en el desarrollo del cáncer de mama, en concreto reduciendo los niveles del gen denominado Her-2/neu. El ácido oleico no sólo parece reprimir la actividad del gen, sino que también mejoró la efectividad de un fármaco contra el cáncer de mama llamado herceptina (Menéndez et al., 2005; Colomer y Menéndez, 2006).

Además del ácido oleico en la prevención y mejora de los procesos tumorales, en los últimos años se está poniendo de relieve el papel fundamental que juegan otros componentes menores del aceite de oliva como el escualeno y los compuestos fenólicos. (Hashim et al., 2008; Escrich et al., 2007; Owen et al., 2000a, 2000b; Gill et al., 2005; Newmark, 1999).

Estudios muy recientes muestran que la actividad anticancerígena observada en los extractos frutales del olivo parece provenir del ácido maslínico y no del ácido oleanólico; por tanto, el ácido maslínico promete ser un interesante componente en el tratamiento preventivo del cáncer de colon (Juan et al., 2008).

Por otra parte, también se está dirigiendo la atención al papel que tiene la nutrición en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunológico. Recientemente se ha comprobado que los ácidos grasos intervienen en varias funciones inmunológicas, participando en la regulación de los procesos inflamatorios asociados a las enfermedades autoinmunes. En este sentido, la ausencia en la dieta de aceite de oliva se traduce en un descenso de la actividad fagocítica de los polimorfonucleares, así como en una reducción de la agregación plaquetaria. Las investigaciones actuales que estudian el papel de los aceites en la función del sistema inmune se dirigen en mayor medida y una

vez más la acción de los ácidos grasos monoinsaturados, más que a los efectos de las moléculas antioxidantes contenidas en ellos, de ahí la importancia del aceite de oliva gracias al alto contenido en ácido oleico.

Entre las enfermedades de carácter autoinmune podemos citar la artritis reumatoide donde los estudios sobre la incidencia del consumo de aceite de oliva ha mostrado ejercer una disminución en el desarrollo de la misma (Linos et al., 1999). En estos estudios los efectos han sido atribuidos tanto a su contenido en ácido oleico, el cual inhibe la formación de metabolitos altamente proinflamatorios, como a las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos (Yaqoob, 1998; Yaqoob et al., 1998; Wahle et al., 2004).

En cuanto a la patología digestiva hay diferentes hechos significativos destacables.

Serrano y col., (1997), compararon los efectos de dietas con diferente contenido en ácidos grasos sobre la secreción gástrica, demostrando que la ingesta de una dieta rica en aceite de oliva es capaz de atenuar la secreción de ácidos gástricos frente a una dieta rica en aceite de girasol, dado el predominio del ácido monoinsaturado del aceite de oliva frente a los poliinsaturados del girasol lo cual le da al aceite de oliva un valor potencialmente beneficioso en el tratamiento del ulcus duodenal. Por otro lado, se ha demostrado que el ácido oleico mejora el vaciamiento gástrico de la vesícula biliar, con la consiguiente disminución del riesgo de cálculos biliares gracias a los terpenos presentes en la fracción insaponificable, así como estimulando la producción de colecistoquinina que favorece el vaciado vesicular a diferencia de otros aceites vegetales que parecen incrementar el riesgo de cálculos biliares. (Pandey et al., 2003). Asimismo, un alto contenido de AGMI y AGPI en la dieta ha sido asociado a un aumento en la síntesis de ácidos biliares, provocando una excreción más rápida del colesterol de la dieta (Bravo et

al., 1998) e igualmente se ha demostrado que la presencia del  $\beta$ -sitosterol del aceite de oliva dificulta la absorción del colesterol.

Íntimamente relacionado con la protección del aparato cardiovascular se halla la regulación de la presión sistólica. De acuerdo con la OMS, la hipertensión arterial es la causa subyacente de más de 7.000 muertes al año en todo el mundo. En este sentido, diferentes estudios resaltan el papel hipotensor de las dietas conteniendo una mayor proporción de los AGPI n-3, (Appel et al., 2005, Engler et al., 1999; Engler y Engler, 2000). Este efecto hipotensor es atribuido, al menos en parte, al incremento en la síntesis de eicosanoides derivados de la serie n-3, los cuales se caracterizan por una mayor ateroprotección frente a sus homólogos de la serie n-6, derivados del ácido araquidónico (Pérez-Jimenez et al., 2002). Del mismo modo, se ha visto que la sustitución de AGS por AGMI en la dieta es capaz de disminuir la presión sistólica y diastólica en un 5-9 % en pacientes sanos (Salas et al., 1999) o predispuestos a desarrollar una hipertensión (Appel et al., 2005). En España la actividad hipotensora inducida por la ingesta de aceite de oliva ha sido mostrada en diversos estudios clínicos (Lahoz et al., 1997; Ferrara et al., 2000; Perona et al., 2004a). Dicha actividad ha sido asociada a cambios estructurales y funcionales en la membrana celular atribuida a la composición de ácidos grasos. Por último, en un estudio muy reciente se ha demostrado que una dieta pobre en productos grasos está inversamente relacionada con padecer hipertensión arterial, el estudio fue realizado con un grupo de ancianos con un alto riesgo vascular, lo cual sugiere que este tipo de dietas pueden tener un efecto protector contra la hipertensión arterial (Toledo et al., 2008).

Un estudio reciente demuestra de forma concluyente una relación inversa entre dieta mediterránea y prevalencia de hipertensión, diabetes e hipercolesterolemia en pacientes de alto riesgo (Sánchez-Taínta et al., 2008).

### **3. METABOLISMO LIPIDICO**

#### **3.1. Los lípidos. Importancia biológica**

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos. Su estructura química varía, y con ella, también lo hacen sus propiedades y su función. Dentro de ellos se encuentran las grasas, que se dividen en saturadas e insaturadas. Están constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno fundamentalmente.

En los alimentos existen fundamentalmente tres tipos de lípidos.

- Triglicéridos o triacilglicéridos
- Fosfolípidos
- Ésteres de colesterol

Juegan los lípidos varios papeles en la dieta humana, un papel sensorial provocando el placer y deleite de los alimentos ingeridos; provocan la sensación de plenitud o saciedad dado el mayor tiempo de digestibilidad que requieren frente a carbohidratos o proteínas; igualmente son una fuente de energía que cuando no es necesaria se almacena en el cuerpo en células específicas denominadas células adiposas o adipocitos; y por último, y no menos importante, es el papel que juegan en el aislamiento térmico corporal o de sostén de estructuras anatómicas, así como determinando la formación estructural de las membranas celulares.

Una característica básica de los lípidos es su hidrofobicidad siendo ello responsable de la baja solubilidad de los mismos frente al agua. Esta característica les viene determinada por su propia estructura química.

##### **3.1.1. Ácidos grasos**

Los ácidos grasos son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada lineal, y con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo (-COOH). Tienen

esencialmente carácter apolar y por tanto, son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos (Lehninger et al., 1993).

Se pueden clasificar los ácidos grasos en saturados e insaturados y desempeñan un importante papel dentro de las grasas, dado que forman parte de los triglicéridos y también de los fosfolípidos (junto con glicerol, grupo fosfato y otros grupos hidrofílicos). Además, se esterifican con los esteroides en general y con el colesterol en particular para dar lugar a ésteres de esteroides y colesterol respectivamente. (Larsson, 1994)

### **3.1.2 Lípidos complejos**

Dentro del grupo denominado lípidos complejos están los fosfolípidos que son lípidos saponificables en cuya estructura molecular además de carbono, hidrógeno y oxígeno, hay también nitrógeno, fósforo, azufre o un glúcido. Son las principales moléculas constitutivas de la doble capa lipídica de la membrana celular, por lo que también se llaman lípidos de membrana y hacen que tengan que darse unas condiciones extremas para que las membranas sufran alguna modificación (Lehninger et al., 1993).

Existen dos grandes grupos de fosfolípidos, los glicerofosfolípidos (o fosfoglicéridos) y los esfingolípidos. Los fosfoglicéridos están compuestos por dos ácidos grasos asociados a una molécula de glicerol, y de un grupo fosfórico en la posición sn-3, unido por enlace fosfodiéster, este grupo proporciona carga negativa a la molécula.

Los esfingolípidos son similares a los fosfoglicéridos, con la diferencia de que la estructura base no es una molécula de glicerol, sino que están compuestos por una molécula de esfingosina, un amino alcohol con una cadena alifática, y un ácido graso, además de un grupo fosfatídico sustituido por un grupo alcohol o amino (Glew., 1997).

### **3.2. Absorción y metabolismo de los lípidos de la dieta**

Debido al carácter hidrófobo de los lípidos su digestión, en la luz intestinal por parte de las hidrolasas, de carácter hidrófilo, no está exenta de cierta dificultad. Hay que señalar que la digestión de los lípidos tiene comienzo en el estómago gracias al proceso de emulsión, es decir, el fraccionamiento de las grandes moléculas de grasa en unidades más pequeñas, gracias a la acción de emulsionantes ingeridos en la dieta entre los que podemos citar los denominados fosfolípidos dietéticos (Bermúdez et al., 2004)

En este proceso de emulsión juega un papel determinante la acción de una lipasa lingual y otra gástrica, llamadas ambas esterasas preduodenales. En este proceso de emulsión, y de fraccionamiento, los ácidos grasos son liberados a la luz gástrica para pasar a la corriente sanguínea unidos a la albúmina plasmática.

Una segunda emulsión tiene lugar en la luz intestinal por medio de las sales biliares y fosfolípidos liberados por la vesícula biliar. Igualmente, la presencia de ácidos grasos en el duodeno estimula la liberación de colecistoquinina, responsable de la contracción vesicular, esto a su vez favorece la llegada de bilis facilitando así la emulsión de las gotas de grasa.

### **3.3. Transporte de los lípidos de la dieta. Las lipoproteínas**

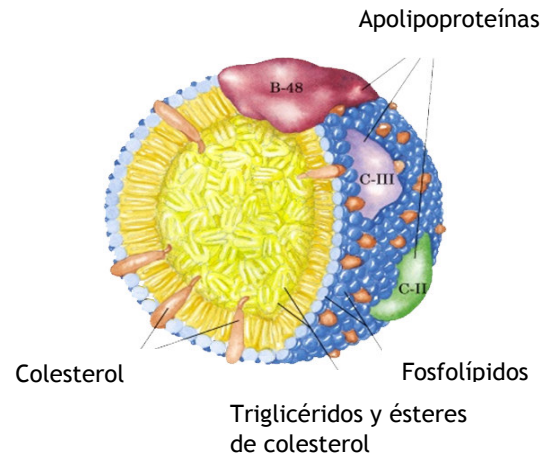
Las lipoproteínas, son complejos macromoleculares esféricos, formadas por un núcleo que contiene lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) y una capa externa polar formada por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas (apolipoproteínas), cuya principal función es el transporte de lípidos tanto endógenos, sintetizados en el hígado, como exógenos, sintetizados en el intestino a partir de los lípidos de la dieta. Dicho transporte se realiza desde los órganos de producción o absorción hasta los tejidos periféricos de utilización y de almacenamiento,

como el tejido muscular y el adiposo, respectivamente. La formación de lipoproteínas es esencial, pues permiten el desplazamiento de moléculas hidrofóbicas a través del medio acuoso que supone el plasma, y a su vez contiene las apolipoproteínas (apos) necesarias para su metabolismo.

### **3.3.1. Estructura y composición de las lipoproteínas**

Las lipoproteínas se componen de un núcleo hidrofóbico, formado por TG y EC, rodeado de una cubierta de carácter anfifílico formada por FL, colesterol libre y apos. Los FL se disponen formando una monocapa y se orientan de forma que las cadenas de AG contactan con el núcleo hidrofóbico, mientras que los grupos polares se orientan al exterior. El colesterol no esterificado se dispone también en esta monocapa lipídica con el grupo hidroxilo hacia el exterior y el núcleo esteroide hacia el interior.

Los apos se sitúan preferentemente hacia el exterior de las lipoproteínas aunque pueden incluir parte de su estructura en el núcleo hidrofóbico. Cuando esto ocurre, los aminoácidos también se disponen según su polaridad dentro de la estructura lipoproteica. Así, los aminoácidos más polares se orientan hacia el exterior de la partícula, a diferencia de aquellos más apolares que lo harán hacia el interior (Mataix, 2002). Las apos, además de proporcionar integridad estructural en las partículas de lipoproteínas, desempeñan un papel vital en el control del metabolismo lipoproteico, pues actúan como ligandos de los receptores de la membrana celular y como cofactores de algunos enzimas clave que participan en su catabolismo. En la Figura 9 se muestra el esquema de la estructura molecular de un quilomicrón (QM), que responde al esquema general de las lipoproteínas.



**Figura 9.** Estructura molecular de un quilomicrón. Modificado de Lehninger et al., 1993.

Las moléculas que integran las partículas lipoproteicas están unidas por fuerzas fisicoquímicas débiles. Esta característica permite el intercambio de material lipídico y proteico entre distintas lipoproteínas, un proceso que tiene lugar durante el desarrollo de los procesos metabólicos a los que están sometidas dichas partículas. Por lo tanto, las lipoproteínas no presentan una estructura estática, ya que ésta depende del estado metabólico en el que se encuentren.

Las lipoproteínas se clasifican en diferentes grupos según su densidad, que es proporcional a su contenido lipídico, así a mayor densidad menor contenido en lípidos.

Los QM (Quilomicrones), son grandes partículas esféricas que transportan los lípidos en sangre hacia los tejidos. Su formación tiene lugar en la luz intestinal.

Las VLDL (Very Low Density Lipoproteins), o lipoproteínas de muy baja densidad, son sintetizadas en el hígado y a nivel de los capilares de los tejidos extra hepáticos (adiposo, mama, cerebro, glándulas



suprarrenales) son atacadas por una enzima *Lipoproteína lipasa* la cual libera a los triacilglicérolos, convirtiéndolos en ácidos grasos libres.

IDL (Intermediate Density Lipoproteins) o lipoproteínas de intensidad intermedia.

LDL (Low Density Lipoproteins), o lipoproteína de baja densidad, son lipoproteínas que transporta el colesterol desde el hígado al resto del cuerpo, para ser utilizado por las distintas células. Un alto nivel de LDL está asociado al riesgo de padecer aterosclerosis, infarto de miocardio y apoplejía.

HDL (High Density Lipoproteins), o lipoproteínas de alta densidad son un tipo de lipoproteínas que transportan el colesterol desde los tejidos del cuerpo al hígado. Estudios epidemiológicos muestran que altas concentraciones de HDL (superiores a 60 mg/dL) tienen un carácter protector contra las enfermedades cardiovasculares como la cardiopatía isquémica e infarto de miocardio. Bajas concentraciones de HDL (por debajo de 35 mg/dL) suponen un aumento del riesgo de estas enfermedades, especialmente para las mujeres. Estas lipoproteínas se subdividen en dos subtipos con distinta densidad, HDL2 y HDL3 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas y composición de las lipoproteínas humanas (Mataix, 2002)

	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
<b>Diámetro (Å)</b>	800-5000	250-800	250-300	200-250	70-120	50-100
<b>Densidad (g/mL)</b>	<0,960	0,960-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,125	1,125-1,210
<b>%Fracción Proteica</b>	1-2	10	18	25	40	55
<b>%Fracción Lipídica</b>	TG	85	55-50	30	7	3
	EC	4	13	22	35	12
	CL	2	8	8	15	4
	FL	8	15-18	22	20	25

### 3.4. Lipoproteínas Ricas en Triglicéridos

Las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) son una población de partículas muy heterogénea formadas por QM y VLDL, así como sus remanentes.

Todas las lipoproteínas, en general, se encargan de transportar los lípidos absorbidos por la mucosa intestinal.

Los QM y las VLDL son las principales fracciones lipoproteicas implicadas en el transporte de lípidos a los tejidos periféricos, desplazándose desde el intestino en el caso de los QM, o desde el hígado en el de VLDL (Biggerstaff y Wooten, 2004). Mientras que los QM transportan principalmente los lípidos procedentes de la dieta, las VLDL contienen lípidos de síntesis endógena. Una vez que se encuentran en la sangre, el siguiente paso es la pérdida de parte de sus triglicéridos por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL). Esto conlleva una considerable disminución del tamaño de la partícula y su conversión en remanentes de QM y VLDL como consecuencia del catabolismo y del intercambio lipídico, y además, las VLDL se transforman en IDL y posteriormente en LDL. Los ácidos grasos liberados llegan al tejido muscular, se oxidan y se utilizan como fuente de energía, mientras que los que llegan al tejido adiposo se reesterifican de nuevo a triglicéridos para almacenarse en el adiposito (Brody, 1994). El destino final de los remanentes es el hígado donde son captados gracias a receptores de la superficie del hepatocito que reconocen la apolipoproteína E.

#### **4. METABOLISMO POSTPRANDIAL**

El metabolismo postprandial son todos aquellos procesos metabólicos interdigestivos que se producen entre las distintas comidas del día, y que suele prolongarse entre 6 y 8 horas.

En el momento actual existe una corriente de investigación dirigida a estudiar las variaciones de los lípidos durante el periodo postprandial, basada en la idea de que en estas condiciones debe haber una mejor correlación entre los lípidos ingeridos y la aparición de enfermedad cardiovascular, que cuando se miden los lípidos en ayunas, habida cuenta que las personas no están en un estado permanente de ayuno. Por otro lado permite conocer las fluctuaciones de otros metabolitos como la glucosa, insulina y ácidos grasos no esterificados (AGNE).

Cuando se estudia el metabolismo postprandial se está midiendo principalmente las variaciones de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y de los AGNE. Los TG tienen dos orígenes, los quilomicrones que contienen TG de origen exógeno y las VLDL producidas por el hígado. La forma más exacta de diferenciarlos es mediante la ultracentrifugación diferencial cuantitativa; sin embargo esta metodología es complicada y costosa.

Los quilomicrones son lipoproteínas grandes y muy poco densas, transportadas por la apolipoproteína B-48, en tanto que las VLDL son más pequeñas, más densas, con un contenido mayor de colesterol y transportadas por la apolipoproteína B-100.

Zilversmit ya llamó la atención, en 1979, (Zilversmit, 1979) acerca del carácter marcadamente aterogénico de este tipo de partículas dado que son metabolizadas por componentes celulares presentes en la pared vascular, incorporando el colesterol transportado y estimulando la formación de placas de ateroma. Por ello, hay que tener en cuenta que los efectos de la dieta sobre la enfermedad cardiovascular (ECV) pueden ser debidos no solamente a sus efectos sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas circulantes en condiciones de ayuno, sino también a su

impacto sobre la concentración de estos elementos durante el prolongado período postprandial. Austin y col., (1990) describió el denominado "fenotipo lipoproteico aterogénico", cuyas características son: niveles moderadamente altos de triglicéridos circulando como integrantes en VLDL con predominio de las formas densas y pequeñas de LDL y finalmente niveles reducidos de HDL. Sin embargo, a la luz de los recientes estudios del estado postprandial esta definición debe incluir también una elevación de los "remanentes de quilomicrones". Posteriormente estudios llevados a cabo por Patsch et al., (1992) fueron los primeros en sugerir que la concentración de TG en plasma en el período postprandial son marcadores independientes en enfermedad coronaria. Se compararon individuos con enfermedad coronaria documentada mediante angiografía frente a sanos, observándose cómo los pacientes con enfermedad coronaria tenían aumentada la respuesta postprandial tanto en magnitud como en duración referida al nivel de triglicéridos. Un análisis de regresión multivariante demostró cómo los niveles de TG postprandiales, niveles de HDL-colesterol, niveles plasmáticos de apo B-100 y la edad, son factores independientes, que juntos muestran una eficacia del 82% en la predicción de la existencia de enfermedad cardíaca coronaria. Este estudio fue además uno de los primeros en demostrar cómo los niveles postprandiales de TG, son un marcador independiente en la predicción de enfermedad coronaria. Karpe en 1999 demostró la existencia de correlación entre progresión de enfermedad coronaria y la existencia de "remanentes de quilomicrones" y la falta de correlación con los niveles de HDL. Por otra parte, recientemente se ha demostrado cómo individuos normolipémicos con enfermedad coronaria declarada poseen niveles mayores de quilomicrones remanentes en comparación con individuos sanos normolipémicos. Por otra parte, estudios en los que se ha medido el grosor de las arterias coronarias mediante ultrasonidos, muestran la existencia de correlación entre la magnitud del nivel de TG en el período postprandial y el grosor de pared de la arteria coronaria (Karpe, 1999). Todos estos

estudios aportan datos avalando que la aterogénesis es básicamente un proceso postprandial. Se ha postulado, tal y como ya hemos comentado, que el estado postprandial es aterogénico debido a la existencia de lipoproteínas ricas en TG. En otras experiencias llevadas a cabo se demuestra cómo tras administrar a pacientes una dieta oral normalizada, tanto los niveles de apo B-48 (marcador de quilomicrones de origen intestinal) y apo B-100 (marcador de lipoproteínas de origen hepático) aumentan. Los autores concluyeron que los quilomicrones son lipilizados por la acción de la LPL, y que en el estado postprandial se produce un aumento de lipoproteínas endógenas ricas en TG (VLDL) debido a la competencia realizada por los quilomicrones, también se ha mostrado cómo un 50% del aumento en TG en la etapa postprandial se asocia con apo B-100 (Griffin, 1995).

Básicamente se cree que el metabolismo lipoproteico postprandial ocurre en dos fases. En una primera fase los quilomicrones de origen intestinal, que transportan lípidos de origen exógeno, interaccionan con LPL de origen extrahepático. Como resultado de la hidrólisis de los TG, se originan los llamados remanentes de quilomicrones, los cuales son posteriormente eliminados del torrente circulatorio por receptores del hepatocito que reconocen apo E. Sin embargo, la aparición de las VLDL, que median el metabolismo lipídico endógeno, determina la existencia de una competencia catabólica, puesto que tanto los quilomicrones como las VLDL son lipolizadas por la misma enzima y captadas por el mismo receptor. Y tal como muestran otros estudios, pacientes con enfermedad coronaria presentan una disminución en la capacidad metabólica de los remanentes de quilomicrones (Gamboa y Lira, 1999). Llegados a este punto es necesario introducir la acción del enzima CETP. Se trata de una glicoproteína plasmática hidrófoba, que cataliza la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL a las VLDL y quilomicrones y triglicéridos en la dirección opuesta, con el resultado de un aumento en los niveles de VLDL-quilomicrones-colesterol, y una disminución en los niveles de HDL-

colesterol. El resultado es la aparición de un perfil lipídico potencialmente aterogénico. Por otra parte, experiencias llevadas a cabo en cultivos celulares, muestran cómo VLDL ricas en colesterol procedentes de pacientes hipertriglicéridémicos son captadas por los macrófagos conduciendo a la formación de células espumosas. Este hecho no tiene lugar en VLDL procedentes de pacientes normotriglicéridémicos. A la vista de estos hechos la disminución de la capacidad catabólica en pacientes con enfermedad cardiovascular, permite que las lipoproteínas ricas en TG se carguen con colesterol, este hecho dificultaría su degradación y facilitaría su toma por los macrófagos con la formación de células espumosas. Otros estudios han demostrado que los QM remanentes tienen la capacidad de atravesar la pared arterial e interactuar con las células vasculares (Mamo et al., 1998; Eliot et al., 2004). Un retraso en el aclaramiento de las TRL se ha correlacionado con lesiones ateroscleróticas (Patsch et al., 1992; Benlian et al., 1997), y sustentando la influencia de los QM remanentes en la aterosclerosis. Estudios posteriores de Proctor et al., (2002) han demostrado que las partículas remanentes que atraviesan la pared arterial y quedan retenidas en el espacio sub-endotelial, sus lípidos pueden interactuar con células endoteliales, iniciando el proceso de aterosclerosis. No se conoce mucho sobre este paso, se sabe que se facilita en función de la disminución del tamaño de las partículas, aunque las diferencias existentes a nivel de las LDL son demasiado pequeñas como para influir en este paso.

La LDL fue la primera lipoproteína a la que se le asignó un papel en la aparición de placas de ateroma. No constituyen una población homogénea, se han descrito hasta tres clases distintas: LDL-III, LDL-II y LDL-I en función del tamaño que presentan. Las de mayor tamaño corresponden a las LDL-I, seguidas de las LDL-II. El predominio de las LDL pequeñas y densas del tipo III se conoce como patrón B y se asocia con un aumento de hasta tres veces del riesgo de infarto de miocardio, entre otros factores por ser estas LDL más susceptibles al proceso de oxidación,

sin embargo este valor bajó cuando en análisis de multivarianza se introdujeron factores tales como nivel de TG, HDL y masa corporal

Estudios recientes sugieren que distintos tipos de dieta grasa puede influir en la composición y tamaño de las TRL y que la fracción insaponificable del aceite de orujo afecta al tamaño y composición de las TRL postprandiales lo cual podría modular hasta cierto punto la aterogenicidad (Cabello-Moruno et al., 2007a; Cabello-Moruno et al., 2007b).

## **5. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es una enfermedad transmisible producida por un retrovirus, que afecta directa y fundamentalmente al sistema inmunológico, produciendo un cuadro de deterioro profundo, progresivo e irreversible de la función inmune. Presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde la infección aguda inicial con sintomatología inespecífica, pasando por un período variable asintomático, hasta desembocar en una serie de infecciones oportunistas que definen el estadio más avanzado de la enfermedad, denominado SIDA.

Representa una pandemia global y altamente letal de la que se conocen casos en todos los continentes y cuya cifra de mortalidad se acerca al 50% de los individuos afectados. Se conocen datos de su existencia al examinar bancos de suero almacenados en 1959 en África Central, así como por el reconocimiento retrospectivo de casos en Europa y EE.UU en la década de los 70, si bien, fué en 1979 cuando se detectaron las primeras manifestaciones clínicas relacionadas con la enfermedad. Sin embargo, es en 1981, con la descripción del primer caso en EE.UU, cuando el SIDA emerge como entidad clínico-patológica claramente definida, alcanzando el número y distribución de casos rápidamente y propiedades de pandemia.

### **5.1. Malnutrición en la infección por el virus del VIH/SIDA**

Entre las consecuencias derivadas de la enfermedad del VIH, el déficit nutricional y la pérdida severa de peso, constituyen dos graves complicaciones que en muchos casos determinan la morbimortalidad de los sujetos afectados. Dicha malnutrición posee un doble componente proteico-energético, en el sentido que no solo se produce una pérdida de



masa corporal, sino que además conlleva un grave desequilibrio en diferentes marcadores bioquímicos.

Uno de los criterios diagnósticos de VIH es el denominado síndrome de consunción o caquético (*wasting síndrome*), ya definido en el año 1987 como una pérdida de peso involuntaria superior al 10% con respecto al peso basal, más diarrea crónica (más de 2 deposiciones diarias durante más de 30 días) o debilidad crónica y fiebre intermitente o constante durante más de 30 días, en ausencia de enfermedad concurrente y otra condición que pueda explicar estos hallazgos.

Un elevado porcentaje de enfermos desarrolla malnutrición en los primeros estadios de la enfermedad, la incidencia y gravedad de la misma aumenta en las fases finales. No obstante, en los últimos años, y gracias a la introducción de los tratamientos antirretrovirales de gran actividad, la incidencia de la malnutrición ha disminuido, aún así sigue siendo una seria complicación a tener en cuenta a pesar de dichos tratamientos. En España, la incidencia de malnutrición en enfermos de VIH viene descendiendo desde el año 1994.

### **5.1.1 Factores nutricionales y desarrollo de la infección**

Los datos epidemiológicos no avalan de forma clara y taxativa una relación directa entre la ingesta de nutrientes y el progresivo desarrollo de la enfermedad, si bien es cierto que el cuidado nutricional de estos pacientes constituye un factor determinante en la supervivencia y progresión de la misma. Los individuos afectados por esta enfermedad pueden fallecer con una pérdida de masa corporal en torno al 50%, constituyendo esta pérdida de peso (Tang et al., 2005) un buen factor predictivo de la mortalidad de estos sujetos, y porcentajes de pérdida de hasta un 5% pueden ser determinantes de una mayor o menor supervivencia de los sujetos infectados. Hay estudios que señalan que una elevada ingesta de determinados micronutrientes tales como vitamina A,

C, niacina y vitamina B1, se asociaría a un descenso en el índice de progresión de la enfermedad (Tang, 2003).

Si la pérdida de peso y el desequilibrio en el balance de micronutrientes constituye ya de por sí un severo problema, estas alteraciones nutricionales además son causa de la manifestación de complicaciones secundarias en el transcurso de la enfermedad, como puede ser infección sistémica por microbacterias.

Existen diversos factores que influirían sobre el desarrollo de la enfermedad entre los que podemos destacar los siguientes:

#### **5.1.1.1. Efectos de la propia malnutrición**

La malnutrición lleva aparejada una serie de cambios estructurales y funcionales en el organismo que a su vez determinan un incremento en la propia malnutrición creándose así un círculo vicioso difícil de romper. Entre estos cambios podemos citar la pérdida de altura e incluso la desaparición de la microvellosidad intestinal responsable de la absorción nutricional a este nivel, reducción de las disacaridasas y aminopeptidasas de la mucosa epitelial, descenso de las secreciones gástricas y pancreáticas, sobrecrecimiento bacteriano y en definitiva malabsorción de carbohidratos y grasas (Grinspoon y Bilezikian 1992).

Igualmente la malnutrición proteico-energética lleva aparejada una mala respuesta inmunitaria, afectando tanto al sistema inmunitario humoral como al celular, alterándose los procesos fagocitarios, disminución en la actividad complemento, descenso en el número y función de linfocitos T, incluyendo los CD4, linfocitos B, macrófagos y células killer (Khovidhunkit et al., 2004)

No menos importante son las repercusiones hormonales derivadas de la malnutrición entre las que cabe destacar, el ascenso del cortisol, reducción de los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas T3 y T4, así como un descenso de los niveles de testosterona y estrógenos circulantes.

## **6. ANORMALIDADES METABÓLICAS LIPÍDICAS EN VIH.**

Las alteraciones del metabolismo glucídico y lipídico, y su rol como factores de riesgo cardiovascular en el paciente VIH, así como las dificultades en el manejo terapéutico, constituyen un nuevo y apasionante campo de trabajo en el área de la medicina interna.

Las anomalías metabólicas observadas en los pacientes tratados con terapia combinada producen un serio impacto ya sea en su imagen corporal o en el incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Se han mencionado casos de infarto agudo de miocardio en pacientes infectados VIH en tratamiento con inhibidores de proteasa (IP) que presentaban una hipercolesterolemia con hipertrigliceridemia.

No hay hallazgos epidemiológicos concluyentes respecto a la relación entre el nivel de triglicéridos plasmáticos y la incidencia de enfermedad coronaria realizados en población general. Los estudios de control de casos muestran una asociación firme y uniforme, y la mayoría de los estudios prospectivos indican una relación positiva significativa.

Según el estudio cardiológico de McKee et al., (1971), el nivel de triglicéridos plasmáticos puede tener mayor valor predictivo en las mujeres. Cuando coexisten niveles altos de triglicéridos y bajos de HDL-colesterol, incluso con aumento mínimo o nulo de LDL-colesterol se incrementa el riesgo de enfermedad coronaria. El estudio cardiológico de Jaross et al., (1994) vincula esta alteración con un muy alto riesgo de enfermedad coronaria. El tratamiento de estos desórdenes metabólicos todavía sigue siendo tema de discusión. En los últimos años se han descubierto nuevos aspectos de la funcionalidad lipídica, su participación en procesos defensivos contra las infecciones, y se ha puesto de manifiesto su papel en la inmunidad natural.

En consecuencia, debe considerarse el metabolismo lipídico como enclavado entre dos sistemas, el metabólico y el defensivo.

Los lípidos y las lipoproteínas forman parte de la inmunidad natural y sufren variaciones durante una reacción inflamatoria inespecífica. Como mediadores defensivos, los lípidos parecen desempeñar varios papeles en la lucha antiinfecciosa: destrucción o lisis, de neutralización, de bloqueo de receptores y de quimiotaxis.

### **6.1. Alteraciones en el metabolismo lipídico en enfermos de VIH**

En humanos, las infecciones y procesos inflamatorios conllevan un descenso del colesterol plasmático, como consecuencia de un descenso conjunto de las LDL y HDL (Sammalkorpi, 1988; Grunfeld, 1992; Auerbach, 1989; Ettinger, 1989). Como en otras infecciones, la causada por VIH está acompañada por disturbios en el metabolismo lipídico y glucídico. Esas anormalidades están presentes aun sin terapia antirretroviral. En el curso de la infección por VIH, en la etapa precoz asintomática desde el punto de vista clínico, aparecen niveles bajos de HDL, seguidos de niveles bajos de LDL. Posteriormente, de manera tardía en el curso de la infección, los niveles de triglicéridos van ascendiendo. El aumento de la síntesis hepática de triglicéridos y la disminución de la catabolización periférica de los mismos, al reducirse la actividad de la lipoproteína lipasa, provoca una hipertrigliceridemia, más o menos intensa, que en algunas ocasiones ha sido utilizada como marcador pronóstico en el curso de enfermedades infecciosas, entre las que destaca el VIH. La ocurrencia simultánea de niveles bajos de colesterol con niveles altos de triglicéridos podría afectar la inmunocompetencia de los sistemas humoral y celular. Los cambios en la membrana celular podrían producirse también por la hipocolesterolemia la que a su vez podría afectar la replicación viral. La disminución de niveles de colesterol-HDL observada en la infección por VIH podría contribuir a la presencia del sincitio (fusión celular) induciendo a su vez, la expresión de fenotipos del VIH. Todos estos mecanismos pueden contribuir a las

relaciones entre los niveles plasmáticos de lípidos con la activación inmunológica y progresión de la enfermedad.

El aumento de los niveles de triglicéridos, y la disminución de HDL, conlleva la aparición de LDL-c, LDL pequeñas y densas, las cuales son fácilmente oxidadas y estimulan la producción de endotelinas y la proliferación de macrófagos en la pared arterial, con un papel importante en la génesis de la aterosclerosis (Grunfeld, 1992).

Se han propuesto diferentes mecanismos responsables del desarrollo de la hipertrigliceridemia del individuo infectado por el VIH:

(a) descenso en la actividad de la LPL, que provocaría una disminución en el aclaramiento plasmático de los triglicéridos (Rodríguez y Muñoz, 2000).

(b) incremento en la síntesis hepática de ácidos grasos (Wilcox et al., 1996).

(c) aumento de la lipólisis, que origina un aumento de los niveles circulantes de ácidos grasos y de la producción de VLDL (Feingold et al., 1993).

(d) aumento en la producción de citoquinas.

(e) existencia de ciclos fútiles de grasa.

### **6.1.1. Citoquinas y cambios metabólicos**

A las citoquinas se le achaca la responsabilidad en las alteraciones metabólicas tanto en modelos animales como en individuos con cáncer o sepsis, por lo que se ha sugerido su participación en las alteraciones del metabolismo lipídico observadas en la infección por el VIH/SIDA, si bien los resultados no son concluyentes. Algunas citoquinas (interferón $\alpha$ , interleuquinas, factor de necrosis tumoral (TNF) juegan un rol importante en la patogenia de las dislipemias en los pacientes infectados por VIH. Las citoquinas median también en la producción de LDL oxidadas, de

endotelinas y de óxido nítrico, responsables de la disfunción endotelial y de la proliferación de macrófagos.

Una de las principales citoquinas implicadas es el TNF- $\alpha$ , que en modelos animales ha demostrado, además de un efecto inmunomodulador y citotóxico, efectos sobre el metabolismo intermediario y balance calórico (Ling, 1997). Además, el TNF- $\alpha$  inhibe la actividad de la LPL, aumenta los niveles de VLDL y aumenta la lipólisis de adipocitos, efectos que contribuyen a la hipertrigliceridemia (Grunfeld, 1992). Sin embargo, la implicación del TNF- $\alpha$  en la hipertrigliceridemia y pérdida de peso asociada a la infección por el VIH/SIDA, no está claramente establecida. Si bien en estudios iniciales se mostraron concentraciones elevadas de TNF- $\alpha$  en ciertos individuos con VIH (Lähdevirta, 1988), resultados posteriores no han observado diferencias en las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  entre individuos VIH y sujetos control (Grunfeld, 1992; Aukrust et al., 1994), así como tampoco correlación entre dichas concentraciones y el grado de pérdida de peso en individuos VIH-positivos (Grunfeld, 1992).

Parte de estos resultados contradictorios podrían relacionarse con la observación de incrementos episódicos de las concentraciones de TNF- $\alpha$  sólo coincidiendo con la existencia de infecciones secundarias (Aukrust et al., 1994), así como con las dificultades para su determinación debido a su escasa vida media.

Otra citoquina implicada en las alteraciones del metabolismo lipídico en la infección por el VIH/SIDA es el INF- $\alpha$ . En individuos VIH se han observado concentraciones plasmáticas de INF- $\alpha$  anormalmente elevadas, que además se correlacionan positivamente con la hipertrigliceridemia (Grunfeld et al., 1991), descenso en el aclaramiento plasmático de triglicéridos (Grunfeld, 1992) e incremento de la síntesis hepática de ácidos grasos durante el ayuno, así como alteraciones de VLDL-C y Apo B. Se desconoce, no obstante, si el INF- $\alpha$  directamente induce hipertrigliceridemia o bien es un marcador de actividad del sistema inmune y de la producción de otras citoquinas.

Igualmente las citoquinas como la TNF- $\alpha$ , INF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, parecen desempeñar un papel significativo en la producción de ciclos fútiles de grasas responsables de parte de la hipertrigliceridemia. Estas citoquinas incrementan los triglicéridos plasmáticos por dos mecanismos:

**A) Aumento de la producción de VLDL:** Esto puede producirse por,

a) un aumento de la lipólisis del tejido adiposo, fenómeno en el cual los ácidos grasos liberados son transportados al hígado los cuales son reesterificados en triglicéridos y secretados al torrente sanguíneo como VLDL. (Memon et al., 1993; Feingold et al., 1992; Feingold et al., 1993).

b) incremento de la síntesis hepática de ácidos grasos con el incremento de la producción de VLDL (Feingold et al., 1992; Nonogaki et al., 1995; Feingold et al., 1990; Grunfeld et al., 1990).

**B) Descenso del aclaramiento plasmático de TRL:** Algunas citoquinas, como el TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6 inhiben la síntesis de la Lipoproteína Lipasa (LPL) en el tejido adiposo y células endoteliales, lo que provoca un descenso en el aclaramiento de las VLDL (Kawakami et al., 1987; Grunfeld et al., 1992; Hardardóttir, 1994; Rodríguez et al., 2000).

### **6.1.2. Fisiopatología de las alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas en el VIH**

En los procesos infecciosos e inflamatorios se producen una serie de alteraciones metabólicas conocidas como la fase de respuesta aguda (FRA). Ésta se caracteriza por inducir cambios en la concentración específica de proteínas plasmáticas, que actúan como mecanismos de reparación de las lesiones causadas por el agente infeccioso; la FRA lleva asociada cambios en las concentraciones plasmáticas de lípidos y lipoproteínas (Hardardóttir, 1994). Entre los cambios podemos destacar un incremento de los niveles de

triglicéridos y VLDL, descenso de HDL y del colesterol total (Sammalkorpi et al., 1988, Grunfeld et al., 1992).

En la infección por VIH se considera a la apoproteína A1 (apo A1), que es el mayor componente proteico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), como un factor antivírico en la lucha orgánica contra el referido retrovirus. La membrana glicoproteica del VIH es esencial para el anclaje y penetración del virus en la célula huésped. Esta membrana vírica parece participar también en la fusión intercelular posterior a la infección con producción de células gigantes, uno de los efectos citopáticos más importantes de la acción patogénica del virus. La membrana viral contiene regiones que pueden plegarse formando hélices alfa anfipáticas. La apo A1 contiene también péptidos anfipáticos, análogos a los que se ha comprobado que inhiben la fusión celular, tanto en células infectadas por VIH como en células infectadas por recombinaciones víricas. Estos péptidos anfipáticos poseen la capacidad de disminuir la infectividad del VIH. El modo en el que la apo A1 ejerce una acción inhibitoria de la infección celular por VIH puede resumirse en los siguientes mecanismos:

- Alterando la capa lipídica bilaminar de la membrana vírica o celular, o ambas, al modificar sus propiedades fusogénicas.
- Interactuando con el dominio fusogénico de la gp41.
- Interfiriendo con el receptor celular de la fusión.
- Dificultando la unión de gp120 con el receptor celular CD4.

La infección por VIH asintomática se asocia con una disminución temprana en las concentraciones plasmáticas de colesterol de alta densidad (HDL). La progresión hacia enfermedad sintomática y a síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causa mayor disminución del colesterol HDL, disminución del colesterol total, elevación de triglicéridos y acumulación de las subclases pequeñas y densas de las LDL. Los niveles de colesterol HDL son menores en pacientes con cuentas bajas de linfocitos CD4. Las anormalidades son una respuesta inespecífica a una infección con



repercusión sistémica existiendo relación entre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos con las concentraciones de  $\beta$ 2-microglobulina y de factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , o de interferón- $\gamma$ . La hipertrigliceridemia se debe, entre otros factores, a disminución de la actividad de la lipasa lipoproteica, debido al acumulo sanguíneo de sus inhibidores (ej. ácidos grasos), por otro lado, la producción hepática de lipoproteínas es anormalmente baja, hecho que limita la severidad de la hipertrigliceridemia.

Por otra parte, los niveles bajos de colesterol HDL se explican por la menor actividad de la lipasa lipoproteica, enzima responsable de un porcentaje importante de la síntesis de las HDL. Además, si existen niveles altos de triglicéridos, la hipertrigliceridemia por sí misma es causa de colesterol HDL bajo (por aumento de depuración de la HDL enriquecidas en triglicéridos). Independientemente de las funciones citadas anteriormente, las HDL protegen de la oxidación de las LDL debido a algunas de las proteínas asociadas a las HDL, tales como la ceruloplasmina, transferrina, Apo A-I que presentan una acción antioxidante (Kunitake et al., 1992; Ehrenwald et al., 1994) por ello un descenso provocado en enfermedades infecciosas y/o inflamatorias podría contribuir a descender la oxidación de las LDL.

Asimismo, se ha observado efectos directos de las infecciones sobre los macrófagos, que podrían incrementar el riesgo de aterosclerosis, ya que toxinas y citoquinas (TNF y IL-1) provocan una acumulación de lípidos (Khovichunkit et al., 2004; Rodríguez et al., 2000).

Por otra parte se han puesto de manifiesto cambios en el metabolismo de las LDL, ya que durante los procesos infecciosos se producen algunos cambios estructurales y funcionales en las LDL que las hacen más proaterogénicas y el SIDA al ser un proceso inflamatorio crónico comparte estos cambios. A continuación se detallan algunos de ellos.

**A) Producción de subclases de LDL de pequeño tamaño**, tal y como ya se apuntó más arriba, las cuales pueden ser oxidadas más fácilmente y atravesar el endotelio, quedando retenidas en la pared endotelial, contribuyendo de esta forma a la aterogenicidad.

**B) Elevada actividad de la enzima factor de activación plaquetaria-acetilhidrolasa.** La composición lipídica y proteica de las LDL se altera en los procesos infecciosos, así es normal encontrar LDL asociados a varios componentes como el factor de activación plaquetaria (PAF), que es un fosfolípido segregado y activado por plaquetas, leucocitos y células endoteliales durante los procesos inflamatorios (Khovidhunkit et al., 2004); entre sus funciones destacan la activación de las células inflamatorias, aumentar la permeabilidad vascular y la hipotensión. En plasma este factor es degradado por el factor de activación plaquetaria acetilhidrolasa (PAF-AH). Esta enzima se encuentra mayoritariamente en plasma, formando parte de las LDL, y el resto en HDL (Feingold et al., 1993). En pacientes con VIH la actividad PAF-AH plasmática está aumentada (Khovidhunkit, 1999), principalmente en las LDL.

Recientemente se ha observado un incremento plasmático de LDL asociado a la actividad PAF-AH en personas con VIH (Khovidhunkit, 1999). Así, se ha puesto de manifiesto que pequeños incrementos de PAF-AH pueden ser beneficiosos para prevenir la oxidación de las LDL que suele ocurrir en los procesos infecciosos, mientras que un incremento prolongado de PAF-AH puede relacionarse con aterosclerosis (Alonso-Villaverde et al., 2003).

Los datos presentados demuestran que existen huecos significativos en el estudio de la dislipidemia asociada al VIH, requiriéndose estudios que analicen la interacción de factores genéticos con los eventos asociados a la infección por VIH, de la misma forma que se necesitan estudios en poblaciones que tienen prevalencia alta de algunas formas de dislipidemias

(ej. colesterol HDL bajo/hipertrigliceridemia) o en individuos con síndrome metabólico.

La incorporación de nuevas terapias antirretrovirales ha aumentado la incidencia de dislipemia en las personas infectadas con VIH. Este hecho junto con la similitud con el síndrome metabólico múltiple, resistencia a la insulina, hipertensión arterial e hiperuricemia y por aportar un elevado riesgo de enfermedad cardiovascular, supone que los cambios metabólicos producidos por los antirretrovirales puedan incidir en la patología cardiovascular a largo plazo.

### **6.1.3. Dislipidemia**

Previa a la incorporación de las combinaciones de antirretrovirales (HAART), se habían descrito numerosas alteraciones metabólicas, principalmente hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia (Grunfeld et al., 1992). También se observaron descensos del colesterol HDL en momentos iniciales de la infección, seguidos de incremento de LDL Colesterol y una reducción del tamaño de estas partículas. En la etapa de VIH se observó un aumento de los triglicéridos, como consecuencia de una elevación de las VLDL (Grunfeld et al., 1992). En este trastorno y secundariamente a una respuesta no específica a una infección crónica, estarían implicadas las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , puesto que existe una buena correlación entre las concentraciones plasmáticas de estos factores y de los niveles de triglicéridos (Grunfeld et al 1992).

El aceite de orujo obtenido a partir del subproducto sólido de la aceituna, posee en su composición una fracción insaponificable, que se halla en concentraciones superiores en este aceite, frente a otros como incluso las otras categorías de oliva. En los últimos años, en la búsqueda de nuevas estrategias para la obtención de un aceite de orujo de mayor calidad, se ha patentado un nuevo procedimiento mediante el cual se minimiza el empleo de altas temperaturas y disolventes, reduciéndose además la aparición de compuestos indeseables y altamente contaminantes. Las características de este novedoso procedimiento permiten obtener un aceite de orujo “de centrifugación” de calidad, que contiene una proporción importante en componentes menores, entre ellos: alcoholes lineales y fitosteroles.

Puesto que el potencial biológico del aceite de orujo de centrifugación obtenido por este nuevo proceso, aún no ha sido evaluado, y debido a las propiedades biológicas atribuidas a los citados compuestos, nos planteamos los siguientes objetivos:

**Objetivo global:**

Estudio de la biodisponibilidad de la fracción insaponificable, principalmente alcoholes lineales, escualeno, fitosteroles ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol) del aceite de orujo en humanos sanos y en enfermos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) comparando los resultados obtenidos cuando se ingiere este aceite con los que se obtienen cuando la ingesta contiene aceite de oliva refinado.

**Objetivos específicos:**

1. Puesta a punto de un método de análisis de los componentes insaponificables presentes en TRL.
2. Estudio de la evolución concentración-tiempo de los componentes menores detectados del insaponificable del OR y del OL en sujetos sanos tras una dieta enriquecida con los mismos en el periodo postprandial comprendido entre las 0 y 6 horas.
3. Estudio de la evolución concentración-tiempo de los componentes menores detectados del insaponificable del OR y del OL en sujetos afectados por el VIH en el periodo postprandial comprendido entre las 0 y 6 horas.
4. Estudio comparativo de la evolución concentración-tiempo entre sujetos sanos y enfermos entre los diferentes componentes menores detectados del insaponificables del OR y el OL en el periodo postprandial citado anteriormente.

## **7. REACTIVOS, PATRONES Y MATERIALES EN GENERAL**

Disolventes: Éter dietílico, etanol, cloroformo, piridina, sulfato sódico anhidro, hexano, alcohol etílico, metanol, heptano, todos de pureza analítica

Potasa alcohólica KOH (2N)

Patrones: Eneicosanol (C<sub>21</sub>OH)  
Epicoprostanol (5 $\beta$ -colestano-3 $\alpha$ -ol) (C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O)  
25-hidroxicolesterol (C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>)  
Laurilaraquidato  
 $\alpha$ -Colesterol

Reactivo de silanización: piridina-hexametildisilazano-trimetilclorosilano 2:1:10.

Reactivo para revelar placas: Diclorofluoresceína al 2% en EtOH (+ 2 lentejas de KOH)

Sistema de extracción Smartsite™ equipado con vacutainer (Vacutainer®, Meylen, Cedex, Francia).

Tubos Polyallomer™ (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA).

Azida sódica (NaN<sub>3</sub>), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y aprotinina

Indicador: fenolftaleína.

Para el aislamiento de TRL: NaCl (densidad 1,006 kg/L), ultracentrifuga Beckman L8-70M preparativa (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA) utilizando un rotor SW 41 Ti.

Para la extracción de los lípidos: KCL 0,1 M, cloroformo/metanol 2:1 (v/v). Centrifuga 5804 R, Eppendorf, vortex, pipeta Pasteur.

## **8. MATERIA PRIMA**

### **8.1. Aceites**

La experiencia completa ha sido realizada con aceites de orujo de oliva de segunda centrifugación (OR) y de oliva refinado (OL) suministrados

durante la campaña oleícola 2003/2005 por la empresa OLEOTEJAR, S.A. (El Tejar, Córdoba).

### **Caracterización físico-química**

Antes de realizar las experiencias y con el fin de caracterizar la materia prima se efectuaron en el aceite las determinaciones de:

- 1- Composición en ácidos grasos.
- 2- Materia insaponificable (esteroles, tocoferoles, escualeno, eritrodil+uvaol).
- 3- Ceras

#### **8.1.1. Composición en ácidos grasos**

Los aceites vegetales y grasas animales presentan una composición ácida específica.

Las determinaciones analíticas se efectúan mediante cromatografía de gases, después de obtener los ésteres metílicos. Estos se obtienen por transesterificación en metanol con metilato sódico en caliente o con potasa metanólica en frío denominándose “método frío” (Cert *et al.*, 1996b), utilizado en este trabajo. Este último fue utilizado debido a su rapidez respecto al método normalizado, y permite una perfecta separación de los ácidos y de los isómeros

#### **Procedimiento**

Se pesa 0,1g de aceite, y se disuelve en 3 mL de heptano, se añade 0,5 mL de potasa metanólica 2N. A continuación se agita y se deja aproximadamente 30 minutos. Se recoge el sobrenadante y se inyecta 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases.

### Condiciones cromatográficas

Se utiliza un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Serie II, equipado con columna capilar de sílice fundida Omegawax Tm 320, de 30 m de longitud, 0,32 µm de diámetro interno y película de 0,25 µm de espesor, y detector de ionización de llama (FID).

Los análisis se llevaron a cabo con una rampa de temperatura que comenzó con 165°C durante 4 minutos, un incremento de 2°C por minuto hasta alcanzar los 200°C, y un mantenimiento de esta temperatura durante 15 minutos. La temperatura del inyector fue de 200°C, y la del detector de 250°C, con un flujo de gas auxiliar (N<sub>2</sub>) de 30 mL/min, flujo de split de 70 mL/min y una relación de split de 1/40. Portador: H<sub>2</sub>.

### Expresión de los resultados

El porcentaje de cada ácido graso se determina según:

$$\% \text{ácido graso } x = (A_x \times 100) / \Sigma A$$

Donde:  $A_x$ . Área del pico del ácido graso x.

$\Sigma A$ . Suma de las áreas de todos los ácidos grasos.

### 8.1.2. Fracción insaponificable

La determinación de los componentes del insaponificable requiere el tratamiento previo de la muestra que consiste en una saponificación de los ácidos grasos para eliminar las interferencias producidas por los triglicéridos, seguida de un aislamiento de esta fracción insaponificable mediante extracción líquido-líquido

#### Procedimiento

Antes de pesar el aceite, en un matraz de 250 mL se añade 1 mL de solución de patrones Eneicosanol (C<sub>21</sub>OH) y α-colestanol de concentraciones 0,05 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente, en cloroformo). Se evapora el disolvente en el que van los patrones. Seguidamente se



pesan 5 g de aceite con exactitud de mg, se le añaden 50 mL de solución alcohólica 2N de KOH (13 g + 20 mL de agua + 80 mL de etanol) y se tiene a ebullición 1 hora. A continuación se le añade agua destilada. Se transfiere todo a un embudo de decantación de 500 mL. Las extracciones se realizan 3 veces con éter etílico añadiendo cada vez 80 mL, los extractos se combinan en otro embudo de decantación. Se lava varias veces con agua hasta pH neutro. La solución de éter se pasa por un filtro que contiene sulfato sódico anhidro. A continuación se elimina el disolvente en una rotavapor y se pesa.

#### **Expresión de los resultados**

$\% \text{ Insaponificable} = (\text{gramos obtenidos} / \text{gramos de aceite pesado}) \times 100$

Para la determinación cuantitativa de los componentes del insaponificable del aceite es necesario, una vez obtenido éste, proceder a eliminar las interferencias, mediante aislamiento de las fracciones correspondiente por cromatografía en placa fina.

#### ***Fraccionamiento del insaponificable: Desarrollo en placa fina (CCF)***

La CCF se realizó sobre placas de vidrio recubiertas de sílica gel 60, de 2,25 mm de espesor (Merck) desarrollando dos veces con la mezcla hexano-éter (65/35).

Para la determinación de esteroides y de eritrodol+uvaol se siguieron los procedimientos indicados en los anexos V y VI del reglamento CEE/2568/91 de la Comisión de la Comunidades Europeas respectivamente

##### **1. Preparación de placas para el aislamiento del insaponificable**

Las placas de sílice deben recubrirse previamente con una solución de potasa en etanol para que retenga en su origen aquella parte de los ácidos libres y también jabones que no han sido eliminados y de esta manera no interferir en la separación.

**Procedimiento**

Se pesan 2,8 g de potasa a los que se les añaden 250 mL de alcohol etílico, Esta solución se pone en una bandeja en la que se sumerge la placa cromatográfica (20×20) durante 1 minuto. A continuación se seca al aire durante, al menos 1 hora y seguidamente se activa en una estufa durante 1 hora a 105°C.

1. Desarrollo cromatográfico de la fracción insaponificable. El insaponificable obtenido una vez pesado se redisuelve en 1,5 mL de cloroformo y se siembra en la placa fina.

Esta placa se desarrolla en una cubeta cromatográfica con hexano:éter (65:35); con dos desarrollos, el primero hasta la mitad de la placa y el segundo completo. Una vez terminado el segundo se seca al aire y se revela pulverizando con diclorofluoresceína (figura 10).

Una vez realizado el desarrollo de la placa se aíslan las bandas correspondientes a los compuestos o grupos de compuestos a determinar, se derivatizan (silanzando) y se inyecta en el cromatógrafo de gases con el método correspondiente a cada uno de ellos.

Aislamiento y derivatización de:

1. Alcoholes + metilesteroles.
2. Esteroles + eritrodiol y Uvaol.

Las bandas correspondientes a estas dos fracciones se raspan y se ponen en un filtro que va sobre un embudito, y éste sobre una pera. Se lava 1º con 10 mL de cloroformo caliente, 2º Dos veces con 10 mL de éter etílico. Se lleva a sequedad mediante rotavapor. A continuación se añade 200 µL de reactivo silanzante (Trimetilcloroxilano/hexametildisilazano en piridina) y se inyectan en el cromatógrafo de gases con las condiciones de alcoholes o esteroles (ver página 57).

Se utiliza cromatografía en capa fina por las ventajas que tiene para el aislamiento de los componentes del insaponificable de un aceite

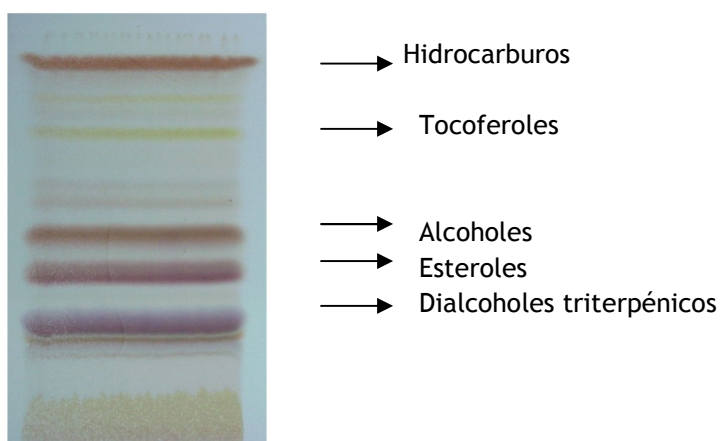
- Rapidez
- Sencillez

Económica

Poder separador



**Figura 10.** Desarrollo de una placa conteniendo el insaponificable con Hexano:Eter (65:35)



**Figura 11.** Cromatografía en Placa fina de la fracción insaponificable de un aceite

Todas las ventajas citadas se dan cuando trabajamos con una sola muestra y cuando disponemos de cantidad suficiente como ocurre cuando se trabaja con un aceite. En nuestro caso para el estudio de insaponificable de TRL sería inviable porque:

1. Tenemos un gran número de muestras a analizar y además, una pequeña cantidad de éstas.

2. No se dispone de cantidad suficiente de algunos de los compuestos y el reactivo para revelar (diclorofluoresceína) no es lo suficientemente sensible.
3. Los patrones utilizados como referencia se desarrollan a velocidad diferente (distinto Rf): 1º porque van solos y 2º porque en algún caso se ha escogido un estándar con una estructura ligeramente diferente a los compuestos a aislar.

***Condiciones cromatográficas para la determinación de alcoholes:***

Columna: SPB5

Temperatura de horno: 215-290°C a 2°C/min

Tiempo a la T<sup>ra</sup> inicial: 5 min

Tiempo a la T<sup>ra</sup> final: 8 min

Inyector: 300 °C

Detector: 300°C

Tiempo de análisis: 50 min

***Condiciones cromatográficas para determinación de esteroides:***

Columna: SPB5

Temperatura horno: 265°C

Inyector: 300 °C

Detector: 300 °C

Tiempo de análisis: 30 min

### **8.1.3. Ceras**

Esta determinación se describe en el Reglamento europeo (UE, 2568/91. Anexo IVb). Indicándose que se usa para detectar presencia de aceites de orujo en aceite de oliva.

Para su análisis se realiza un fraccionamiento del aceite, en columna de cromatografía con gel de sílice hidratado para, una vez más, evitar interferencias de los triglicéridos.

Se pesa en un matraz en forma de pera de 25 mL de capacidad 0,5 g de aceite y a continuación se añade 1 mL de solución de laurilaraquidato al 0,1% m/v en hexano. Se agita para disolver y se vierte cuantitativamente el contenido en la columna; la elución se realiza con la mezcla hexano:éter (98.5:1.5) a un ritmo de aproximadamente 2mL por minuto. Se utiliza el indicador Sudán I al 1% en hexano para impedir la incorporación de triglicéridos (León y Cert, 1994), ya que al ser coloreado y eluir junto con los triglicéridos podemos parar la elución cuando el color alcance la parte baja de la columna sin que llegue a salir de esta manera los triglicéridos. A continuación se evapora el eluido en rotavapor; por último redisuelve en 5mL de heptano del que se inyecta 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases.

#### **Condiciones cromatográficas**

Se ha utilizado un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Serie II, equipado con columna capilar con fase SPB<sup>TM</sup>-5 de 15 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y película de 0,1  $\mu$ m de espesor, y detector de ionización de llama (FID).

Los análisis se llevaron a cabo mediante inyección "on column" con una rampa de temperatura que comenzó a 70°C, un incremento de 45°C por minuto hasta alcanzar los 180°C, e incremento de 5°C por minuto hasta alcanzar los 310°C, temperatura que se mantiene durante 15 minutos. La

temperatura del inyector fue de 63 °C, y la del detector de 350°C, con un flujo de gas auxiliar (N<sub>2</sub>) de 30 mL/min.

#### **Expresión de los Resultados**

Se determinan las áreas correspondientes a los picos del patrón interno y los ésteres alifáticos de 40-46 átomos de carbono y el contenido total de ceras en mg/kg, se calcula según:

$$\text{Ceras (mg/kg)} = (A_x \times m_s \times 1000) / (A_s \times m)$$

Donde:

A<sub>x</sub>. Σ Áreas de los picos C<sub>40</sub> - C<sub>46</sub>

A<sub>s</sub>. Área del pico del laurilaraquidato.

m<sub>s</sub>. Peso en miligramos del laurilaraquidato.

m. Peso en gramos de la muestra

## 9. EXPERIENCIA CLÍNICA

### 9.1. Selección y características de los voluntarios

#### 1- Grupo de voluntarios sanos

Se llevó a cabo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de la ciudad de Sevilla, realizándose la selección entre el personal voluntario del Instituto de la Grasa

Se comenzó la selección incluyendo en este grupo personas sanas de edades comprendidas entre los 20 y 31 años, que no cumplían los criterios de exclusión que a continuación se detallan:

1. Antecedentes de hipertrigliceridemia familiar
2. Hipertensión secundaria
3. Enfermedad cardiovascular, renal o hepática
4. Obesidad
5. Diabetes
6. Alcoholismo
7. Tabaquismo
8. Estar sometido a tratamiento farmacológico que afecte a los parámetros de estudio.

Teniendo en cuenta estos criterios, se concluyó la selección con la participación de 9 voluntarios cuyas características se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características de los voluntarios sanos

Sexo	Varones	Media
Edad (años)	20-31	26,2±4,3
Índice de Masa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	20,1-26,2	23,7±2,0

A cada uno de ellos se le realizó un análisis bioquímico y hematológico completo, y se consultó su historial clínico para verificar que no cumplían ninguno de los criterios de exclusión. Todos los ensayos se realizaron de

acuerdo con los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa y de la Declaración Universal de la UNESCO. Para ello, se ha elaborado un protocolo de análisis para el estudio con humanos aprobado por el Comité Institucional para Investigación en Humanos del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Los sujetos voluntarios dieron consentimiento escrito a este protocolo después de ser convenientemente informados tanto oralmente como por escrito y fueron exhortados a evitar el consumo tanto de bebidas alcohólicas como de tabaco durante el día precedente al comienzo del experimento.

## **2- Grupo de voluntarios infectados por VIH**

Se reclutaron voluntarios varones infectados por VIH procedentes de la Unidad de Infecciosos del Hospital Costa del Sol de Marbella (Málaga, España), de edades comprendidas entre 31 y 49 años con índice de masa corporal (IMC) 17,1-26,19. Los voluntarios fueron seleccionados en base a los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

### **Criterios de inclusión**

- Edad comprendida entre 31 y 49 años.
- Padecer infección por el VIH demostrada mediante técnicas de enzimoimmunoanálisis realizados en el Hospital Costa del Sol.
- Estar bajo HAART.
- Informados y carta de aceptación por parte de los mismos a participar en el estudio.
- No cumplimiento de los criterios de inclusión.
- Personas con hipertrigliceridemia secundaria, enfermedad de tipo cardiovascular, renal o hepática, obesidad, alcoholismo, diabetes, fumadores.
- Tratamientos farmacológicos que afecten al metabolismo lipídico, distinto de la terapia antirretroviral.



Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa y de la Declaración Universal de la UNESCO.

Para ello se elaboró un protocolo de análisis para el estudio con humanos que fue aprobado por el Comité Institucional para Investigación en Humanos del Hospital Universitario Costa del Sol (Marbella, España). Los voluntarios dieron su consentimiento por escrito a este protocolo después de ser convenientemente informados verbalmente y por escrito. Asimismo, fueron exhortados a evitar el consumo tanto de bebidas alcohólicas como de tabaco durante el día precedente al comienzo del estudio postprandial, dada la influencia de estos factores sobre el metabolismo lipídico.

Teniendo en cuenta estos criterios, se concluyó la selección con la participación de 11 voluntarios cuyas características se recogen en la tabla 3.

**Tabla 3.** Características de los voluntarios infectados con el VIH.

Sexo	Varones	Media
Edad (años)	31-49	40,8±5,4
Índice de Masa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	17,1-26,2	22,4±3,1

## **9.2. Ingesta Experimental**

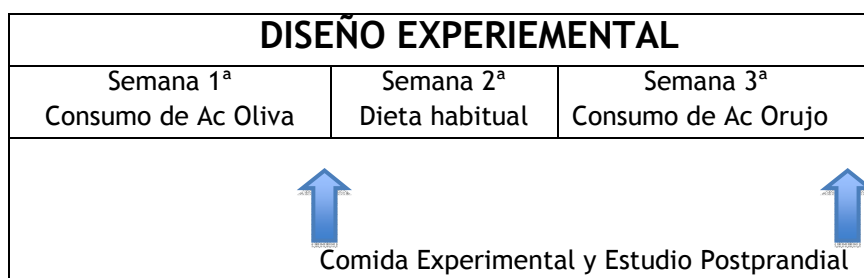
La comida experimental consistió en 100 g (peso seco) de pasta cocida, 130 g de salsa de tomate que se acompañó con una rebanada de pan de molde integral de 28 g y un yogurt desnatado de 125 g. Esto se enriquece con 70 g del aceite a estudiar; alternando el de orujo con el de oliva con un periodo de lavado de una semana. Esta comida proporcionó 4523 kJ de energía, de los cuales el aceite aportó 2587 kJ.

La comida se ingirió a primera hora de la mañana, en condiciones de ayuno previo de 12 horas. De cada sujeto se tomó una muestra de 9 mL de sangre en condiciones basales inmediatamente antes de la comida

experimental. A continuación, se extrajeron muestras de sangre cada hora durante horas.

### 9.3. Diseño Experimental

Con cada grupo de voluntarios el ensayo experimental se llevó a cabo a lo largo de tres semanas. A cada participante se le suministró con antelación el aceite que iba a ser utilizado en cada ensayo para que lo consumieran durante la semana previa, a fin de conseguir una normalización dietética entre los voluntarios y minimizar las variables que afectan al metabolismo lipídico postprandial. Los voluntarios consumieron durante la primera semana aceite de oliva en su dieta y tras esta semana se sometieron a un análisis de control basal antes del experimento: perfil lipídico y bioquímico plasmáticos, así como hemograma y estudio de coagulación y se llevó a cabo el protocolo de extracción de sangre. Durante la segunda semana los voluntarios continuaron con su dieta habitual que sirvió de lavado. Durante la tercera semana consumieron orujo tras la cual se llevó a cabo el segundo ensayo postprandial.



## **9.4. Extracciones**

### **9.4.1. Extracción Basal**

Tras 12 horas de ayuno nocturno, a cada voluntario se le extrajo una muestra de 9 mL de sangre en condiciones basales por punción de la vena cubital con un sistema Smartsite™ equipado con vacutainer. La sangre fué recogida en tubos Vacuette® provisto de separador para suero Clot Activator.

### **9.4.2. Ingesta de las comidas experimentales y extracciones durante el periodo postprandial.**

Inmediatamente después de la extracción basal, los sujetos recibieron la comida experimental. Durante todo el periodo de estudio se permitió a los voluntarios el libre acceso a la ingestión de agua y a un café solo sin azúcar. Se les permitió la realización de ejercicio físico muy ligero.

Se extrajeron muestras de sangre a los sujetos cada hora durante un período postprandial de 7 horas. Las muestras se recogieron en tubos Vacutainer, de las mismas características que los de la extracción basal. El suero fué separado mediante centrifugación a 3.000 rpm, durante 8 min, a 15°C de temperatura. Como conservantes, se añadieron al suero, azida sódica (NaN<sub>3</sub>), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y aprotinina hasta alcanzar concentraciones de 1 mM, 10 µM y 0,5 mg/L, respectivamente (Karpe et al., 1993). Una parte del suero se congeló a -80°C hasta proceder al fraccionamiento de las lipoproteínas y otra parte se utilizó para determinar el perfil lipídico de cada voluntario a cada hora.

A todas las muestras extraídas se les determinó:

Colesterol total, LDL y HDL.

Triglicéridos.

Apolipoproteína A (Apo-A) y apolipoproteína B (Apo-B)

Todos estos parámetros se determinaron cuantitativamente mediante kits enzimáticos convencionales.

## **10. SISTEMÁTICA ANALÍTICA DESARROLLADA PARA LA EVALUACIÓN DE COMPONENTES MENORES EN TRL**

### **10.1. Aislamiento de TRL**

Las TRL (Índice de flotación ( $S_f$ )>400, densidad <0,93 kg/L) fueron aisladas a partir de 4 mL de suero depositados bajo 6 mL de una solución de NaCl (densidad 1,006 kg/L) contenida dentro de tubos Polyallomer™ (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA). Las TRL se aislaron por ultracentrifugación (39.000 rpm, 18 horas, 12°C) (Mills et al., 1989) utilizando un rotor SW 41 Ti en una ultracentrífuga Beckman L8-70M preparativa (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA). Tras el proceso de ultracentrifugación se recogió la fase blanquecina que quedó separada por flotación en la parte superior del tubo

### **10.2. Extracciones de los lípidos de TRL. Método Folch**

Para la obtención de los lípidos procedentes de las lipoproteínas ricas en triglicéridos se sigue, con ligeras modificaciones, el método Folch, que se resume a continuación:

Se parte de un volumen igual a 1500  $\mu$ L de TRL que se pone en un tubo cónico. Se añaden 5 mL de la mezcla: cloroformo/metanol (2/1). Se agitan los tubos en vortex durante 1 min. Si no llegan a separarse dos fases, se añaden unas gotitas de KCL 0,1 M. A continuación se agita nuevamente en vortex y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min (también se puede dejar decantar toda la noche).

La fase clorofórmica (inferior) se retira con una pipeta Pasteur larga y se pone en un tubo de evaporador. La operación se repite añadiendo 2 mL de cloroformo/metanol y se vuelven a agitar los tubos en vortex durante 1

min. Se centrifuga nuevamente a 3000 rpm 10 min y se retira la fase clorofórmica, añadiéndola al tubo del evaporador. Por último éste se evapora a sequedad y se redissuelve el residuo con 1 mL de la mezcla cloroformo: metanol (2:1, v/v).

### **10.3. Obtención de la fracción de insaponificable de los lípidos procedentes de TRL**

Se toma un volumen igual a 600 µl de muestra que estaba disuelta en la mezcla cloroformo:metanol y se pone en un vial. A continuación se procede de la siguiente manera:

1. Se lleva la muestra a sequedad.
2. Se adicionan 33 µL de disoluciones de cada uno de los patrones siguientes: Epicoprostanol, Eneicosanol y 25-Hidroxicolesterol.
3. Se evapora a sequedad.
4. Se adiciona 1 mL de KOH (2N) en metanol/agua [80/20 (v/v)].
5. Se tapan los tubos.
6. Se calienta a 70°C durante una hora.
7. Se adiciona 1 mL de agua destilada.
8. Se adicionan 5 mL de éter etílico.
9. Se agita y se centrifuga durante 10 min a 3000 r.p.m. y 15°C de temperatura.

Se forman dos fases, la superior contiene el insaponificable disuelto en éter y en la inferior van los jabones disueltos en agua.

10. Se recoge la fase superior en un matraz.
11. Se adiciona nuevamente 5 mL de éter a la fase inferior y se repite la extracción hasta un total de tres veces.
12. La fracción insaponificable se lava con agua destilada, y se le añade una gota de fenolftaleína para asegurar de que no contiene jabón.

13. Se adiciona sulfato sódico anhidro en un embudo que ponemos sobre una pera.
14. Se filtra el contenido del matraz sobre la pera.
15. Se evapora a sequedad, mediante rotavapor. El residuo así obtenido es el insaponificable exento de humedad.
16. Se redisuelve en 150  $\mu\text{L}$  de cloroformo.

#### **10.4. Procedimiento Cromatográfico**

##### **Equipo CG**

El sistema cromatográfico esta compuesto por un cromatógrafo de gases modelo HP 5890 serie II, que consta de las siguientes partes integrantes:

1. Sistema de inyección automático Agilent 6890,
2. Detector de ionización de llama (FID).
3. Horno provisto de Columna capilar: J&W GC, DB-5Ms, de sílice fundida (30 m  $\times$  0.250mm  $\times$  0.25 $\mu\text{m}$ )
4. Sistema informático para la adquisición y tratamiento de los datos

##### **Condiciones del análisis**

Temperatura del Horno: Programada de 180 a 270°C, con incremento 8  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Isotherma final durante 40 min.

Gas portador: Hidrógeno con una presión de cabeza de 100 kPa.

Temperaturas del inyector y del detector: 290°C y 300°C respectivamente.

En la Figura 12 se recoge un esquema del procedimiento llevado a cabo desde el suero hasta la inyección cromatográfica.

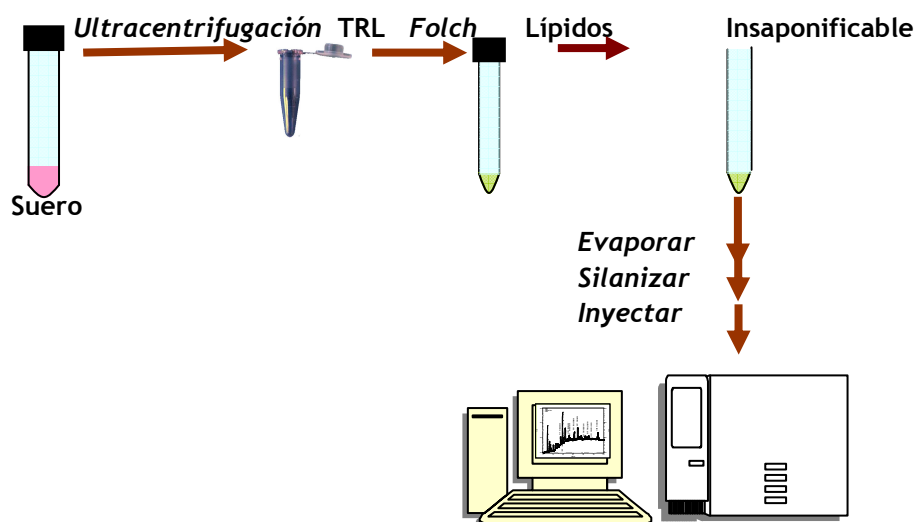


Figura 12. Esquema analítico para la evaluación del insaponificable en TRL

## 11. IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES MENORES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

Para la identificación de aquellos compuestos separados cromatográficamente, mediante el sistema descrito en el apartado 10.4, y que no coinciden con los estándares que tenemos, hemos procedido a su identificación mediante espectrometría de masas. Para ello, se utiliza un espectrómetro de masas tipo Ion trap modelo Polaris Q (Thermo, Austin, Tejs) acoplado directamente a un cromatógrafo de gases Trace GC 2000 provisto de columna cromatográfica DB5 de las mismas características que la descrita en el apartado anterior. La inyección de la muestra se realiza mediante el sistema split, se usa Helio a un flujo de 1 mL/min como gas portador. Se utilizó un impacto de ionización de 70 eV. 250  $\mu$ A de corriente de emisión. La programación de la temperatura cromatográfica es la misma que la descrita en el citado apartado.

## **12. LÍMITES DE DETECCIÓN**

El límite de detección (LDD) es la concentración mínima de sustancia que puede ser detectada por un método analítico determinado. Intuitivamente, sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra, que contiene el analito, que seríamos capaces de discriminar de otra obtenida a partir de una muestra sin analito presente.

Cuando en esta definición se introduce la palabra fiabilidad, esto implica necesariamente la introducción de estadística y hablamos en ese caso de límite de cuantificación (LDQ) en la propia definición y en su cálculo posterior (Vial y Jardy, 1999).

En métodos cromatográficos de análisis en los que el pico correspondiente al analito debe ser distinguido de la línea de base cromatográfica, el LDD puede calcularse midiendo el ruido del cromatograma de diversos (normalmente tres) blancos de muestra que han sido sometidos a todo el proceso analítico. Por otra parte, dado que el método que proponemos no se utiliza para análisis de trazas en alimentos o como el caso de antidopaje, donde la legislación requiere la ausencia de ciertos analitos, el límite de detección debe estimarse de forma rigurosa, como se describe en el documento de la IUPAC (IUPAC 1995). Hemos procedido, por tanto, a su determinación preparando diluciones sucesivas de los patrones interno, e inyectado en las mismas condiciones que las muestras experimentales, llevándolas primero a sequedad y silanizando.

## **13. FACTOR DE RESPUESTA**

Para el cálculo de los factores de respuestas se preparan las siguientes disoluciones

A. Disolución de patrones:

$\alpha$ -colestanol (0.5 mg/mL)

C<sub>21:0</sub>-OH (0.4 mg/mL)



Epicoprostanol (0.2 mg/mL)

B. Disoluciones de :

Colesterol (1,0 mg/mL)

Escualeno (1,0 mg/mL)

C<sub>28:0</sub>-OH (1,0 mg/mL)

β-Sitosterol (1,0 mg/mL)

A partir de cada una de las disoluciones que vamos a utilizar como disolución de patrón interno y de las de los compuestos a determinar el factor de respuesta se preparan 5 nuevas disoluciones mediante diluciones, tomando los volúmenes que a continuación se detallan

**Tabla 4.** Preparación de diluciones para el cálculo de factores de respuesta

Volúmenes (mL)			
Disolución Patrón (A)	Disolución muestra (B)	Disolvente	(C)
1	0,25	3,75	Solución 1
1	0,5	3,5	Solución 2
1	1	3	Solución 3
1	2	2	Solución 4
1	3	1	Solución 5

De cada una de las disoluciones anteriormente preparadas (C) se toman 200 µL que se llevan a sequedad, se silanizan y se inyectan en las mismas condiciones de nuestro método de análisis. Obtenemos así 5 valores de áreas para cada uno de los patrones y 5 para cada compuesto, obteniéndose para cada inyección un valor de RF para cada compuesto. El valor final de cada uno es la media de los 5 obtenidos.

$$RF = \frac{[\text{Componente}]}{[\text{Patrón}]} \times Q$$

Donde:

RF = factor de respuesta

[Componente] = concentración de un componente

[Patrón] = concentración de patrón

Q = Área Componente/Área Patrón

#### **14. RECUPERACIÓN Y REPETIBILIDAD**

Para la determinación de la recuperación y repetibilidad del método se formó un “stock” de suero a partir de varias muestras al que se le realizó todo el proceso:

Extracción de quilomicrones

Obtención de los lípidos

Obtención del insaponificable

La metodología fue realizada añadiendo todos los patrones desde el principio del proceso y también, a otra parte de la muestra stock, se le realizó el proceso añadiendo los patrones al final justo antes de silanizar. La diferencia entre ambos es una medida de la recuperación. Se hicieron seis replicados para cada método y cada muestra a su vez fue inyectada en el cromatógrafo 3 veces (Total = 18 inyecciones).

#### **15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de los análisis de la composición de los aceite se han expresado como valores medios  $\pm$  desviaciones estándar. El efecto del método analítico fue analizado mediante análisis de la varianza de una sola vía con un nivel de significación del 5%.

Los resultados obtenidos en los análisis de la composición de TRL se representaron en gráficamente en función del tiempo. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) del número de experimentos ( $n$ ) indicado en cada caso.

El análisis estadístico se realizó con el programa Graphpad Prism, seguido del t-student. La diferencia entre los valores obtenidos se consideró significativa a partir de  $P < 0.05$ .

## 15. Composición de la Ingesta Experimental

La composición nutricional de la comida empleada fué recogida de la declarada en los envases de cada uno de los alimentos y se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Composición Nutricional de la Comida Empleada en el Estudio (g).

	PESO	CARBOHIDRATOS	PROTEÍNAS	GRASA <sup>1</sup>	ENERGÍA (KJ)
Pasta (trigo)	100	72,0	11,0	1,0	1450
Salsa de tomate	130	7,2	1,6	>0,1	153
Rebanada de Pan <sup>2</sup>	28	2,5	2,3	0,8	283
Yogurt desnatado	125	6,0	5,5	0,1	50
Aceite <sup>3</sup>	70	-	-	70,0	2587
<b>Total</b>	<b>453</b>	<b>87,7</b>	<b>20,4</b>	<b>71,9</b>	<b>4523</b>

<sup>1</sup>Fraccionamiento de la grasa excluyendo el aceite (g): Saturada (0,6), Monoinsaturada (0,5), poliinsaturada (0,8).

<sup>2</sup>Fibra (1,7).

<sup>3</sup>Aceite de orujo (OR), aceite de oliva refinado (OL).

Consistió en 100 g (peso seco) de pasta cocida, 130 g de salsa de tomate enriquecida con 70 g de aceite, OL u OR objetos de este estudio, que se acompañó de una rebanada de pan de molde integral de 28 g, y un yogurt desnatado de 125 g. Esta comida proporcionó 4523 kj de energía, de los cuales el aceite aportó 2587 kj.

## 16. COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES UTILIZADOS

### 16.1. Composición en ácidos grasos

El análisis de la composición en ácidos grasos de los aceites de OL y OR empleados en el estudio fué realizado mediante cromatografía de gases previa transesterificación de las muestras. En la tabla 6 se detallan los resultados de dicho análisis. Las principales diferencias entre los aceites utilizados en este trabajo en relación a la composición en ácidos grasos se observa en la proporción de oleico (18:1, n-9), siendo ligeramente inferior

en el aceite de orujo, y en la concentración de linoleico (18:2, n-6), cuyo contenido fué notablemente inferior en al aceite de OL que en el de OR (Tabla 6). El **oleico** es un ácido graso monoinsaturado al que se han atribuido tradicionalmente los efectos cardiosaludables del aceite de oliva (Pérez-Jiménez et al., 1995; Ginsberg et al., 1990; Mattson y Grundy, 1985). No obstante, estudios demuestran que otros ácidos grasos, así como su distribución posicional en los triglicéridos, y otros componentes como los polifenoles y la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen pueden tener igual o mayor importancia que el propio ácido oleico para reducir o prevenir la incidencia cardiovascular (Perona et al., 2003; Escriba et al., 2003; Abia et al, 2001; Martinez-Dominguez et al, 2001).

La concentración de **ácido linoleico** (18:2, n-6), fué aproximadamente dos veces superior en el OR (8.07 %) que en el de OL (4.52 %) (Tabla 6), cuyos valores suele estar comprendido en el amplio rango de 3,5 - 21,0 %. Este dato es muy variable ya que depende de la variedad de la aceituna y de las condiciones agronómicas. Normalmente los valores obtenidos están más cercanos a bajas cantidades de linoleico; sin embargo, los aceites de orujo tienen una parte importante del aceite procedente de la semilla (hueso) de la aceituna y, que como cualquier otra semilla en general, se caracteriza por ser rica en ácidos mas insaturados como es el caso del linoleico. Este ácido es esencial para los humanos, pues son incapaces de sintetizarlo e interviene en diversos procesos biológicos (Aparicio y Harwood, 2003), debiendo ser proporcionado cada día en la dieta. Por otra parte, los aceites utilizados en estos estudios contienen cantidades moderadas de los ácidos saturados mirístico, palmítico, esteárico, aráquico, behénico y lignocérico (total = 14,12%). Por último, las composiciones de los dos aceites utilizados en estos ensayos están dentro de la normativa establecida para los aceites de orujo y oliva (EEC, 1991).

**Tabla 6.** Composición en ácidos grasos de los aceites empleados en el estudio (% s/total de EM).

ACIDOS GRASOS	Aceite de OL <sup>1</sup>	Aceite de OR <sup>1</sup>
Mirístico (14:0)	0,02	0,02
Palmitico (16:0)	11,06	10,47
Palmitoleico (16:1, n-7)	0,83	0,77
Esteárico (18:0)	3,56	3,00
Oleico (18:1, n-9)	78,39	75,59
Trans-oleico (18:1, n-9)	0,12	0,18
Linoleico (18:2, n-6)	4,55	8,21
$\alpha$ -Linolénico (18:3, n-3)	0,62	0,71
Aráquico (20:0)	0,42	0,46
Gadoleico (20:1, n-9)	0,25	0,34
Behénico (22:0)	0,12	0,17
Lignocérico (24:0)	0,05	0,07

<sup>1</sup>Valores expresados como porcentaje del total de ácidos grasos  
Media de 2 determinaciones

## 16.2. Componentes menores

Entre los componentes menores de los aceites se encuentran los compuestos insaponificable, éstos se determinan gravimétricamente tras un proceso de saponificación, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.1.2, y supuso un 1,6 % en el aceite OR de segunda centrifugación y 1.3 % en el caso del OL.

El contenido de los componentes de la fracción insaponificable, entre los que se encuentran los esteroides, fué analizado por cromatografía de gases siguiendo los métodos oficiales recomendados. En la Tabla 7 se recogen los resultados obtenidos, para los componentes menores de los aceites, donde se pueden apreciar notables diferencias tanto en los constituyentes de la materia insaponificable entre ambos aceites como en otros componentes menores saponificables como los ácidos terpénicos oleanólico y maslínico, y las ceras.

Tabla 7. Componentes menores de los aceites OL y OR empleados en estos estudios.

COMPONENTES MENORES		Aceite de OL	Aceite de OR
<b>FRACCIÓN INSAPONIFICABLE</b>			
Escualeno	(mg/kg)	2642	2543
Esteroles	Totales (mg/kg)	1120	2245
	$\beta$ -Sitosterol (%)	95.2	95.2
	Campesterol (%)	3.2	2.4
	$\Delta$ 7-Estigmasterol (%)	0.2	0.3
	Brasicasterol (%)	0.1	0.1
	Colesterol (%)	0.3	0.3
	Otros (%)	1.2	1.7
Tocoferoles	Totales (mg/kg)	145	345
	$\alpha$ -Tocoferol (%)	94.3	80.7
	$\beta$ -Tocoferol (%)	4.2	8.9
	$\gamma$ -Tocoferol (%)	1.5	10.4
Triterpenos	Eritrodiol+Uvaol (mg/kg)	17	337
<b>ÁCIDOS</b>	<b>Oleanólico (mg/kg)</b>	Nd	416,0
<b>TERPÉNICOS</b>	<b>Maslínico (mg/kg)</b>	Nd	110,0
<b>CERAS</b>	<b>(mg/kg)</b>	123	3484

El análisis de los resultados revela una diferencia notable en la cantidad de esteroles totales, el doble en el aceite de orujo de segunda centrifugación (OR) que en el aceite de oliva (OL), aunque el porcentaje de los distintos esteroles se mantiene con respecto a estos. Esta diferencia podría proporcionar un efecto beneficioso al consumo de aceite OR, pues existen diversos estudios que atribuyen interesantes propiedades a los esteroles de las plantas, capaces de reducir los niveles de LDL como consecuencia del descenso de absorción de colesterol, así como de disminuir el desarrollo de la lesión arteriosclerótica (De Jong et al., 2003). Además, se ha descrito que el  $\beta$ -sitosterol tiene efecto antiinflamatorio (de la Puerta et al. 2000) así como actividad protectora frente a la oxidación de las LDL *in vitro* (Andrikopoulos et al., 2002) del mismo modo que el campesterol, otro de los esteroles más abundantes.

Los tocoferoles, especialmente el  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, son importantes antioxidantes, también tienen una gran actividad biológica, pues ejercen una acción inhibitoria de la oxidación de las LDL con efecto creciente, en este caso, en el siguiente orden (Andrikopoulos et al., 2002):

$\alpha$ -tocoferol <  $\beta$ -tocoferol <  $\gamma$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol es la especie mayoritaria, aunque se encuentra en un porcentaje inferior al que se encuentra en los oliva de otras categorías. Por tanto, aunque  $\beta$ - y  $\gamma$ -Tocoferol, son las especies minoritarias, se encuentran en mayor proporción respecto al total de tocoferoles en el aceite de orujo. No se observa, como con el resto de otras categorías o variedades de aceites de oliva presencia de  $\delta$ -Tocoferol.

En relación al contenido de hidrocarburos el mayoritario en los aceites de oliva es el escualeno, precursor bioquímico de los esteroides. Los análisis mostraron concentraciones de 2642 y 2543 mg/kg para OL y OR respectivamente. En relación a este dato no hay valores establecidos en la bibliografía consultada, ya sea sobre cantidades mínimas o máximas. Sin embargo, los aceites de oliva tanto vírgenes como refinados y de orujo son los que contienen la mayor cantidad de escualeno en comparación con otros aceites comestibles (Gutfinger y Letan, 1974). Algunas publicaciones atribuyen al escualeno un importante efecto antioxidante, destacando su papel protector frente a la alteración térmica (Malecka, 1991).

En relación a los dos principales dialcoholes triterpénicos presentes en estos aceites, **eritrodiol** y **uvaol**, son compuestos que se aíslan conjuntamente con los esteroides y se cuantifican en esta fracción. Son mucho más abundantes en el aceite de orujo de segunda centrifugación que en los aceites de oliva y por esta razón se ha establecido como norma oficial para diferenciar estas categorías de oliva. Así, el límite establecido en la legislación para un aceite de oliva es del 4,5% de los esteroides totales. No existe límite superior para los orujos. El aceite OR empleado en



estos estudios presenta un valor de 13,05%, mientras que el valor encontrado para OL es 1,49%. Varios autores atribuyen a los dialcoholes triterpénicos actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda y crónica (De la Puerta et al., 2000; Máñez et al. 1997; Recio et al. 1995). Además de la acción anti-inflamatoria, en el caso del uvaol, se ha visto que desempeña un papel antioxidante en la oxidación in vitro de lipoproteínas LDL (Andrikopoulos et al., 2002).

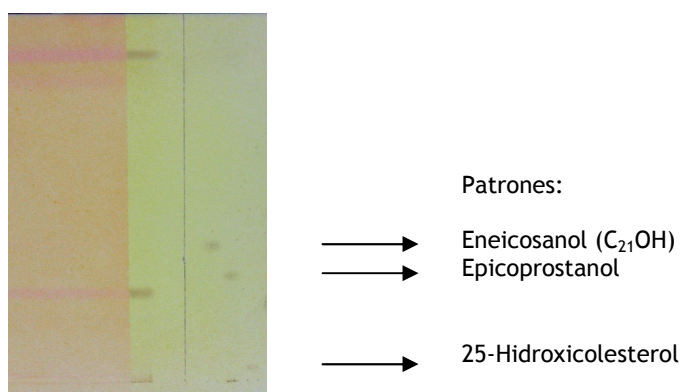
Por último, y en relación al contenido en **ceras** existen notables diferencias entre OR (3484 mg/kg) y OL (123 mg/kg) así como entre OR y los valores tabulados para los aceites de oliva de otras categorías cuyo límite está establecido en  $\leq 250$  mg/kg.

## **17. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA EL AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE COMPONENTES INSAPONIFICABLES EN LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS.**

### **17.1. Aislamiento del insaponificable en TRL**

El mismo procedimiento de obtención y aislamiento o purificación llevado a cabo con los aceites ha sido llevado a cabo con las TRL. Una vez obtenido el insaponificable a partir de TRL lo depositamos en forma de banda en una placa cromatográfica de sílice y se introduce en una cubeta conteniendo hexano:éter 65:35, se realiza un doble desarrollo para posteriormente proceder a su revelado con diclorofluoresceína y al aislamiento de las bandas obtenidas. En la Figura 13 se muestra una cromatografía en placa fina de una muestra de insaponificable obtenido a partir de las TRL, donde además se han puesto, en la parte derecha de la placa tres patrones, para localizarlos en la muestra. Como puede observarse es muy difícil la identificación de los diversos grupos de compuestos en las TRL, fundamentalmente por la baja concentración en

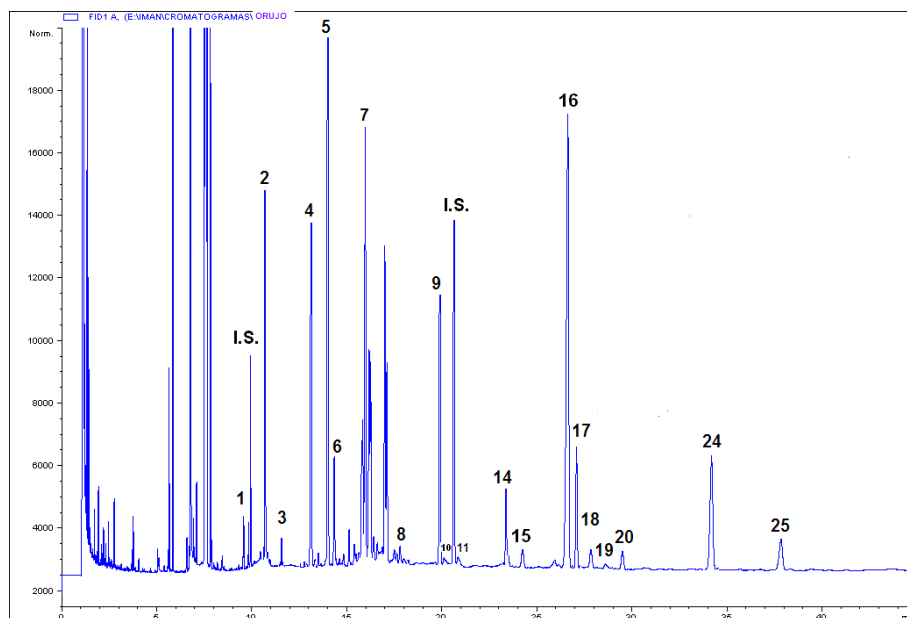
que se encuentran. Por este motivo y para evitar que ningún compuesto sea aislado con otra familia o que, por no visualizarse, se quede sin aislar en la placa, a partir de los insaponificables obtenidos de las TRL procedemos a su cuantificación sin un aislamiento previo. Para ello, se inyecta la muestra de insaponificable completa, tras su derivatización, con la mezcla trimetilcloroxilano:hexametildisilazano:piridina, obteniéndose un único registro cromatográfico para todas las familias de compuestos. El procedimiento se lleva a cabo con todos los insaponificables obtenidos a partir de todas las muestras de TRL y, al mismo tiempo se ha aplicado a los aceites utilizados en estas experiencias.



**Figura 13.** Cromatografía en placa fina (doble desarrollo hexano:eter 65:35, revelado con diclorofluoresceína la parte izquierda y revelado con yodo la derecha) de la fracción insaponificable de un TRL

## 17.2. Análisis mediante GC de las fracciones insaponificables

La columna cromatográfica y la programación de temperaturas seleccionadas permite la obtención de los cromatogramas de las Figuras 14 y 15. Los registros mostrados corresponden a los insaponificables completos de un aceite OR y el una muestra de TRL respectivamente.



**Figura 14.** Cromatograma (CG) de TMS derivados del insaponificable del aceite OR

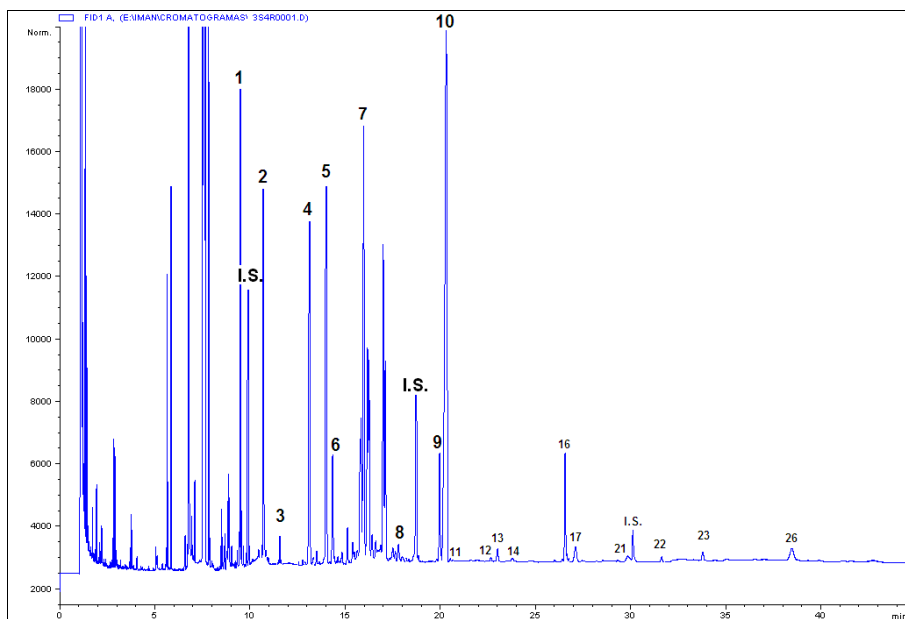


Figura 15. Cromatograma (GC) de TMS derivados del insaponificable de los TRL

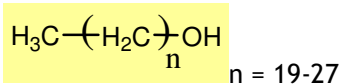
### 17.3. Identificación de componentes. Análisis de los espectros GC-MS.

La mayoría de los compuestos se pueden identificar aislando previamente cada una de las familias de compuestos mediante desarrollo en capa fina de la fracción insaponificable de los aceites y, al mismo tiempo, en el caso en que se disponía, utilizando un patrón puro. Los resultados definitivos de la identificación, en todos los casos y fundamentalmente para aquellos compuestos en los que no se dispone de estándar o no se sabe su posición exacta en la placa fina fueron obtenidos mediante el acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS). Los registros obtenidos son comparados con los disponibles en la librería de datos del espectrómetro de masas del Instituto de la Grasa.

A continuación se analizan los espectros realizados.

#### Picos 1-9. Grupo de alcoholes alifáticos

El estudio de los espectros de masas de los picos 1 a 4 y 6 a 8 con tiempos de retención (RT) entre los minutos 9.0 y 20.0, analizados como trimetilsilil (TMS) derivados, muestra un ión molecular escaso o ausente, acompañado de un intenso ión a  $(M^+ - 15)$  característico de los grupos trimetilsililados y que corresponde al pico base ( $B^+$ ) de los espectros: 355, 383, 411, 439 y 467; estos son los de los picos mayoritarios. En la zona baja de los espectros se nos muestra la serie de fragmentos a  $m/z = 83, 97, 111, 125, 149$  característica de una cadena lineal hidrocarbonada. Se trata, por tanto, de la serie homóloga de alcoholes lineales de 20 a 28 átomos de carbono.



En la Figura 16 se recogen a modo de ejemplo los registros CG-MS de los picos 1 y 7 y que corresponde a los alcoholes alifáticos de 20 y 26 átomos de carbono respectivamente.

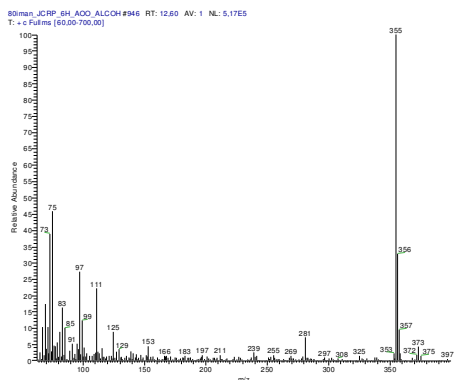
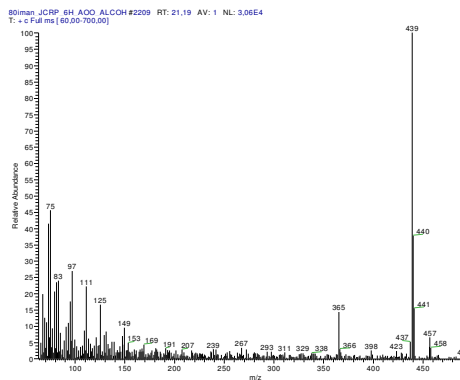
**A) Pico 1. Rt = 9.0****B) Pico 7. Rt = 16.1**

Figura 16. Espectros de masa de los picos 1 y 7 obtenidos por GC-MS

En relación al **pico 5**, la Figura 17 recoge el espectro CG-MS del compuesto que eluye a tiempo de retención = 13.9. El espectro muestra un ión molecular escaso a  $m/z = 410$  y un pico  $B^+$  a  $m/z = 81$ . Estos datos concuerdan con el espectro del escualeno, según la librería de datos.

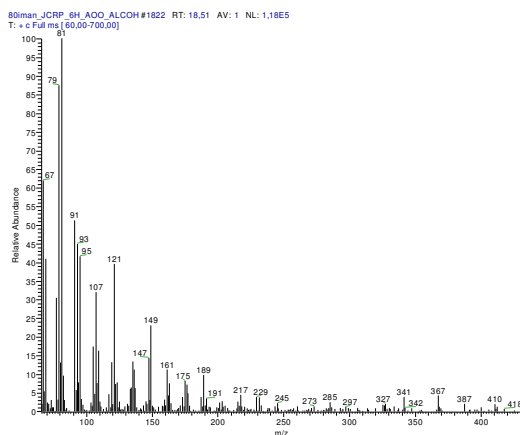
**Pico 5. Rt = 13.9**

Figura 17. Espectro de masas del Escualeno

## Picos 10 y 14-20. Familia de Esteroles

El espectro de masa del pico 10 muestra un ión molecular a  $m/z = 458$  y un  $B^+$  a  $m/z = 368$ . Se trata del espectro del colesterol

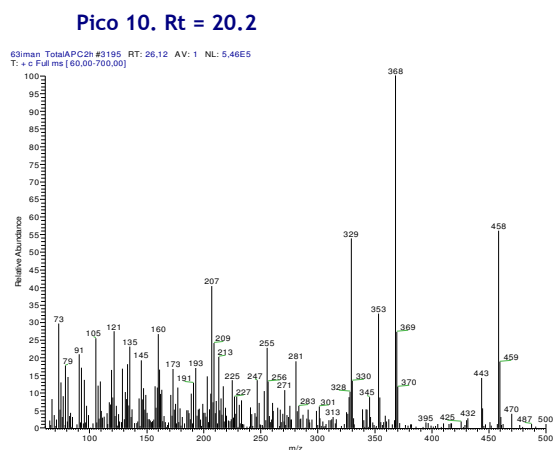


Figura 18. Espectro de masas del Colesterol

## Fitosteroles

La familia de fitosteroles ha sido aislada a partir del insaponificable del aceite de OR, mediante desarrollo en CCF y tras obtención los TMS derivados se inyecta en las condiciones propuestas y se sitúan en el cromatograma los diferentes esteroides. Las Figuras 19 y 20 recogen los MS de dos componentes de esta familia.

El compuesto que eluye a  $R_t = 24,2$  presenta un ión molecular a 73 y un  $B^+$  a  $m/z = 484$ , el resto de las fragmentaciones mostradas en el espectro coinciden con el Estigmasterol.

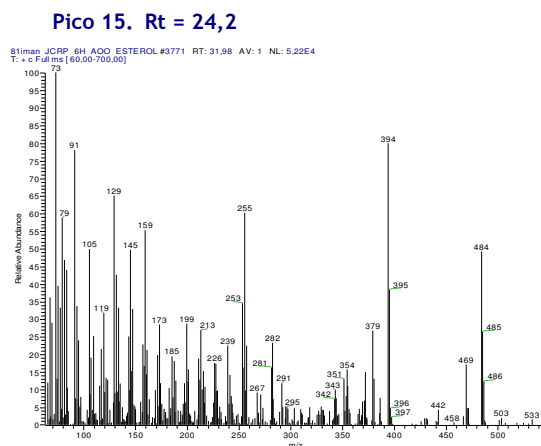


Figura 19. Espectro de masas correspondiente al Estigmasterol

En relación al pico 16 que eluye a  $R_t = 26,4$  min, presenta un  $M^+$  a  $m/z = 207$  y un  $B^+$  a  $m/z = 486$ . Estos datos junto con las restantes fragmentaciones recogidas en el espectro de la Fig. 20 nos indican que el pico 16 es el  $\beta$ -Sitosterol.

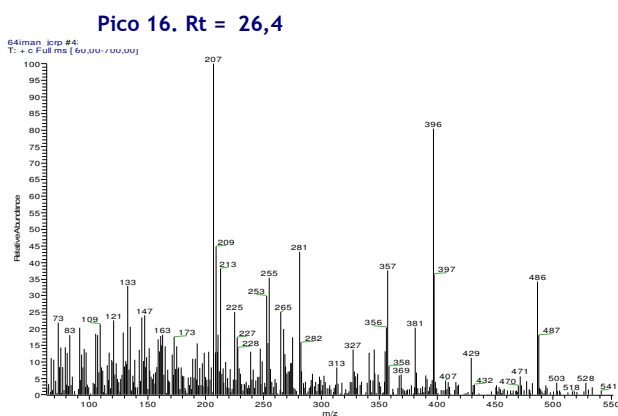
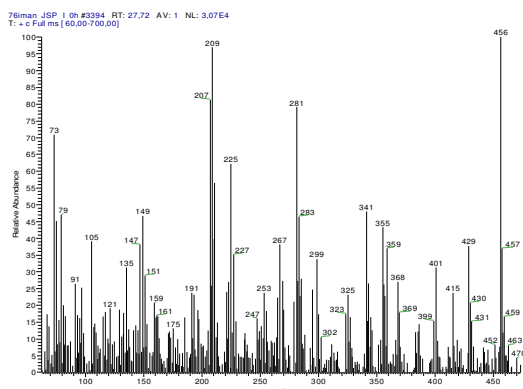


Figura 20. Espectro de masas correspondiente al  $\beta$ -Sitosterol



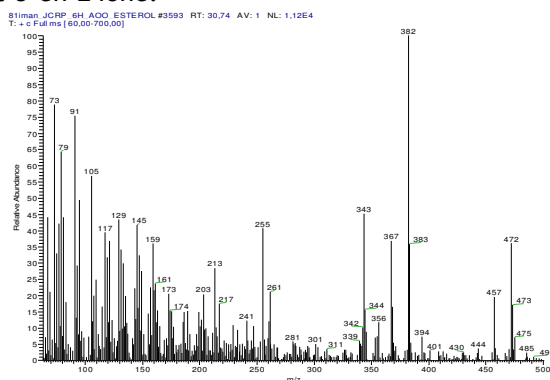
**Picos 12, 13, 21, 22, 23 y 26. Oxiesteroles y oxifitosteroles**

El espectro correspondiente al pico 12 muestra un abundante pico base B<sup>+</sup> a m/z= 456. El resto de las fragmentaciones del espectro obtenido coincide con el encontrado en la librería de datos para el Colest-7-en-3ol (Figura 21)



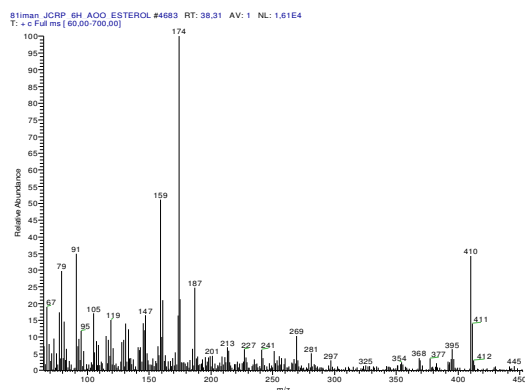
**Figura 21.** Espectro de masas del pico 12 (Rt = 22.6 min), correspondiente al Colest-7-en-3ol.

En relación al compuesto señalado como pico 13, que eluye a Rt = 23,0 el espectro muestra un ión molecular a m/z= 382 y un pico base B<sup>+</sup> a m/z= 472. Este espectro coincide con el encontrado en la librería de datos para el Colest-5-en-24one.



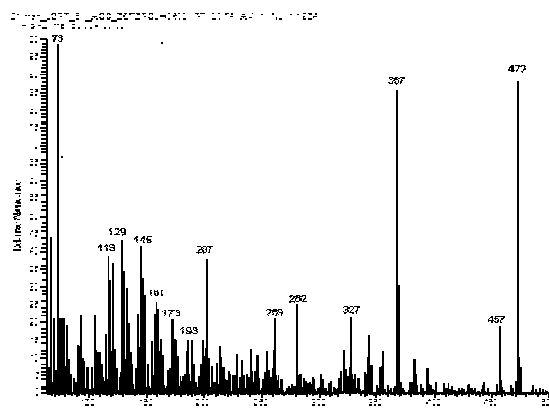
**Figura 22.** Espectro de masas del pico 13 (Rt = 23.0 min) Colest-5-en-24one

El compuesto que eluye a  $R_t = 30,0$ , pico 21, muestra un ión molecular  $M^+$  a  $m/z = 174$  y un pico base  $B^+$  a  $m/z = 410$ . El espectro obtenido coincide con el encontrado en la librería de datos para el estigmasta-3,5-dien-7-one



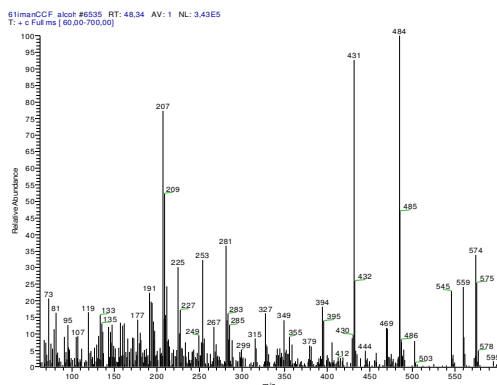
**Figura 23.** Espectro de masas del pico 21 ( $R_t = 30.0$  min), correspondiente al Estigmasta-3,5-dien-7-one

El pico 22 muestra un ión molecular  $M^+ = 73$  y un pico base  $B^+ = 472$ . El espectro de masas obtenido coincide con el encontrado en la librería de datos para el 7-Cetocolesterol



**Figura 24.** Espectro de masas del pico 22 ( $RT = 31.5$  min), correspondiente al 7-Cetocolesterol

El pico 26 a  $R_t = 38,5$  presenta un ión molecular a  $m/z$  484 y  $B^+ = 574$ ; coincide con a el sitostanetriol

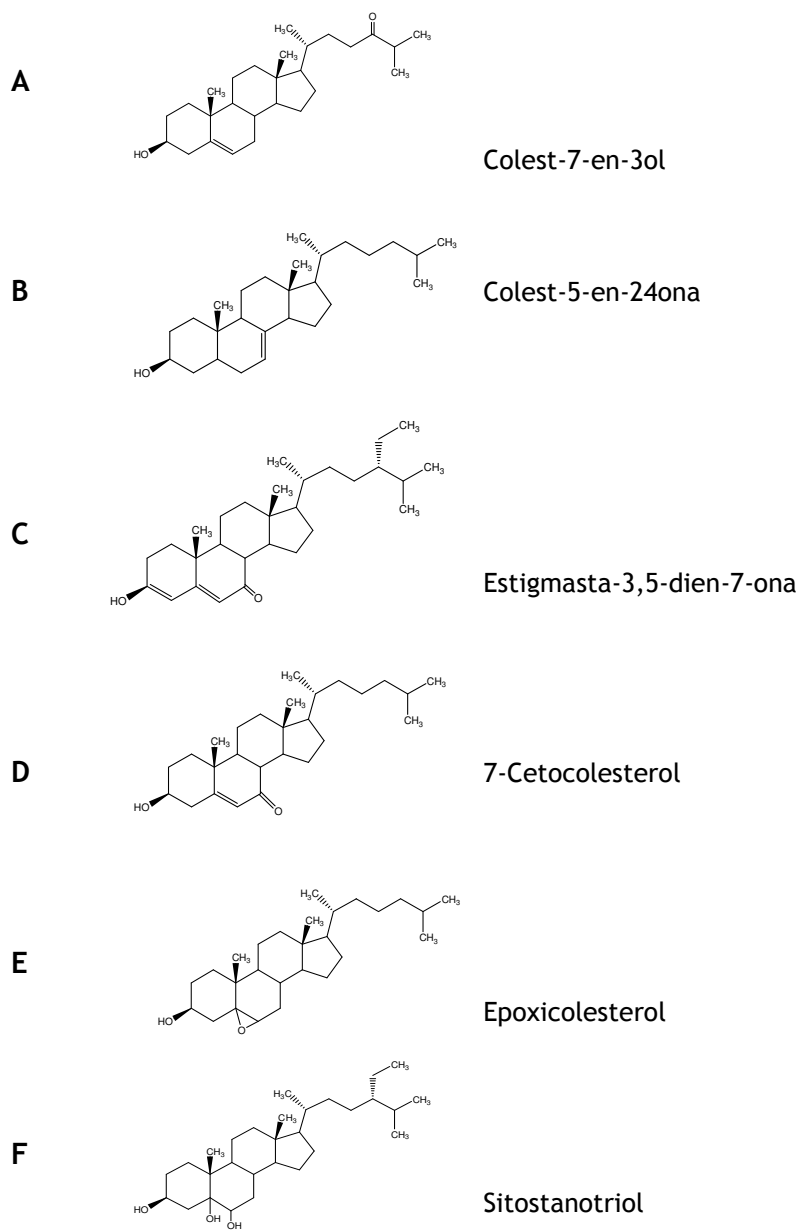


**Figura 25.** Espectro de masas del pico 26 ( $R_t = 38.5$  min), correspondiente al Sitostanetriol

Las estructuras de los principales esteroides oxidados identificados en nuestras muestras se encuentran recogidas en la Figura 26.

En la Tabla 8 se recogen los tiempos de retención de todos los compuestos identificados presentes, tanto en los aceites como en las TRL. Hay dos zonas en los cromatogramas, la primera desde el inicio de la inyección hasta el minuto 9.0 y la segunda entre los tiempos de retención 16,1 y 18,0 y que corresponden por una parte a hidrocarburos lineales saturados e insaturados, y por otra parte a los alcoholes triterpénicos y metilesteroides que no han sido objeto de estudio.

Hay que mencionar igualmente el hallazgo de picos, en los cromatogramas de algunas muestras, dentro del área perteneciente a los oxifitosteroides, que no hemos podido identificar, como también por otra parte hemos podido detectar cantidades insignificantes de otros componentes que debido a su pequeña concentración no nos ha sido posible llevar a cabo su cuantificación.



**Figura 26.** Estructuras de los principales oxi-esteroles y -fitosteroles encontrados.

Tabla 8. Tiempos de retención de todos los compuestos identificados

	<sup>1</sup> Nº	COMPONENTES	Rt/min
ALCOHOLES ALIFÁTICOS	1	C <sub>20</sub> OH Eicosanol	9,0
		<i>C<sub>21</sub>OH (patrón interno)</i>	<i>9,9</i>
	2	C <sub>22</sub> OH Docosanol	10,9
	3	C <sub>23</sub> OH Tricosanol	11,8
	4	C <sub>24</sub> OH Tetracosanol	13,0
	6	C <sub>25</sub> OH Pentacosanol	14,4
	7	C <sub>26</sub> OH Hexacosanol	16,1
	8	C <sub>27</sub> OH Heptacosanol	18,0
	9	C <sub>28</sub> OH Octacosanol	20,0
HIDROCARBUROS	5	Escualeno	13,9
TOCOFEROLES	11	α-Tocoferol	20,8
ESTEROS Y DIALCOHOLES TRITERPÉNICOS		<i>Epicoprostanol (patrón interno)</i>	<i>18,7</i>
	10	Colesterol	20,2
		<i>α-Colestanol (patrón interno)</i>	<i>20,3</i>
	14	Campesterol	23,5
	15	Estigmasterol	24,2
	16	β-Sitosterol	26,4
	17	Δ <sup>5</sup> -Avenasterol	26,9
	18	Δ <sup>5,24</sup> -Estigmastadienol	27,7
	19	Δ <sup>7</sup> -Estigmastenol	28,5
	20	Δ <sup>7</sup> -Avenasterol	29,4
	24	Eritrodiol	33,9
	25	Uvaol	38,0
	OXIESTEROS	12	Colest-7 en-3-ol
13		Colest-5-en-24one-oxy	23,0
21		Estigmasta-3,5-dien-7-one	30,0
		<i>25-Hidroxicolesterol (patrón interno)</i>	<i>30,1</i>
22		7-Cetocolesterol	31,5
23		Epoxicolesterol	33,7
26		Sitostanetriol	38,5

1. Numero asignado al compuesto en el cromatograma

#### 17.4. Límites de detección

A partir de las disoluciones de los patrones usados como estándares internos para cuantificación de las muestras en estudio, se prepararon diluciones sucesivas, hasta  $15 \cdot 10^3$  veces la empleada para la cuantificación de las muestras. Se llega al valor de LDD experimental para cada compuesto cuando la altura del pico cromatográfico del compuesto en cuestión es 3 veces la señal del ruido de la línea base y así, se establecen las cantidades mínimas detectables indicadas en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Límites de detección del método propuesto a partir de los patrones internos

Patrones	LDD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Áreas
$\text{C}_{21}\text{OH}$	0.026	>1433.25
Epicoprostanol	0.108	>2380.99
25-Hidroxicolesterol	0.010	>2319.12

#### 17.5. Factores de respuesta.

Para la determinación cuantitativa de los componentes del insaponificable de los aceites siguiendo la metodología analítica propuesta, hemos decidido utilizar dos patrones internos: Eneicosanol ( $\text{C}_{21}\text{OH}$ ) con el que se determina la familia de alcoholes y  $\alpha$ -colestanol para la familia de esteroides. Se hace así en los métodos normalizados, y al pertenecer ambos a las mismas familias a cuantificar se asume que tienen el mismo factor de respuesta. Para el caso de la determinación de escualeno, se ha decidido estudiar el factor de respuesta de este frente a ambos patrones. Para la cuantificación de los componentes del insaponificable de TRL se utiliza  $\text{C}_{21}\text{OH}$  para la familia de alcoholes y se ha sustituido el  $\alpha$ -colestanol, patrón utilizado para los aceites, por epicoprostanol ( $5\beta$ -colestano- $3\alpha$ -ol) ya que al

haber una cantidad importante de colesterol, este solaparía en parte con el patrón de  $\alpha$ -colestanol.

**Tabla 10.** Factores de respuesta con respecto al alcohol  $C_{21}OH$  y al  $\alpha$ -colestanol.

Respuesta (n = 4 )	
Escualeno/ $C_{21}OH$	0,998 $\pm$ 0.003
Escualeno/ $\alpha$ -colestanol	1,011 $\pm$ 0.002
$C_{28}OH/C_{21}OH$	1,004 $\pm$ 0.001
Colesterol/Epicoprostanol	1,021 $\pm$ 0.002

Los datos obtenidos muestran que el escualeno tiene una respuesta cromatográfica muy similar, tanto a la del eicosanol como a la del  $\alpha$ -colestanol, las diferencias pueden ser perfectamente debidas al error de la determinación. Por tanto, y ante estos valores para la determinación de escualeno, hemos decidido hacerlo a partir del  $C_{21}OH$ .

## 17.6. Recuperación y Repetibilidad de las diferentes familias de componentes del insaponificable

### 17.6.1. Resultados en TRL

Para poder hacer el cálculo de la recuperación del método aplicado a los componentes menores insaponificables de TRL, con muestra suficiente para realizar los diferentes replicados, se preparó una muestra "stock" de suero a partir de varias muestras, a la que se le realizó todo el proceso:

1. Extracción de TRL
2. Obtención de los lípidos

3. Obtención del insaponificable
4. Derivatización
5. Inyección y cuantificación

El método desarrollado se le ha aplicado a la muestra stock 6 veces y cada uno de los insaponificables obtenidos tras derivatización mediante silanización (TMS-derivados) son inyectados 3 veces. Justo antes de la silanización e inyección se le añaden los patrones previamente descritos. Se obtienen, por tanto un total de 18 inyecciones. El mismo procedimiento se realiza a otra alícuota del stock de muestra, pero en este caso los patrones son añadidos desde el principio del ensayo, de la misma manera cada insaponificable obtenido y sililado es inyectado 3 veces.

La concentración de alcoholes se ha calculado a partir de las relaciones de área  $C_{21}OH$ -Componentes alcohólicos ( $C_{20}$ - $C_{28}$ ). El grupo de esteroides ha sido cuantificado mediante las relaciones de área epicoprostanol-esteroides. De la misma manera se hace con los oxisteroides y el eritrodol con el área del 25-hidroxicolesterol. Por último, hemos cuantificado el escualeno y el  $\alpha$ -tocoferol a partir de las relaciones de área de  $C_{21}OH$ .

Con los datos obtenidos se han elaborado las tablas 11 y 12, que corresponden a la muestra cuantificada con patrones añadidos desde el principio del procedimiento y justo antes de la silanización, respectivamente.

Teniendo en cuenta los valores recogidos en ambas tablas se puede determinar, por diferencia, la recuperación de cada uno de los grupos de compuestos.

Si no se utilizan patrones desde el principio las recuperaciones están entre el 38 y 65% dependiendo de la familia de compuesto. Estos resultados nos indican la necesidad de añadir los estándares desde el principio del procedimiento; de esta manera se evitan las pérdidas que la manipulación del propio método conlleva y así la reproducibilidad es



mayor. No sería por tanto factible, en este caso, la determinación cuantitativa mediante una recta de calibrado muy usual en el caso de una escasa manipulación de las muestras, como ocurre en la determinación de tocoferoles, mediante HPLC.

**Tabla 11.** Resultados del estudio del método propuesto de TRL obtenidos añadiendo todos los patrones desde el principio (Resultados expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TRL)

	Alcoholes Totales	Esteroles Totales	Oxiesteroles Totales	Hidrocarburos (Escualeno)
Valor Medio	5,88	48,44	0,29	0,53
Número determinaciones	18	18	18	18
Desv Standard	0,99	2,15	0,06	0,03

**Tabla 12.** Resultados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TRL obtenidos añadiendo los patrones al final (Resultados expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TRL)

	Alcoholes Totales	Esteroles Totales	Oxiesteroles Totales	Hidrocarburos (Escualeno)
Valor Medio	2,74	21,96	0,19	0,20
Número determinaciones	18	18	18	18
Desv Standard	1,00	1,17	0,15	0,11

### 17.6.2. Resultados en aceites

En el caso de los aceites se procede de la misma manera, aquí se cuantifica añadiendo dos patrones desde el comienzo de la sistemática: Eneicosanol ( $C_{21}OH$ ) para el grupo de alcoholes, escualeno y tocoferoles y  $\alpha$ -colestanol para la familia de esteroides. En el caso de los aceites se han comparado los resultados con los métodos oficiales.

La tabla 13 resume los resultados obtenidos para los componentes del insaponificable del aceite OR mediante la aplicación de los dos protocolos. Si comparamos los resultados obtenidos podemos concluir que las diferencias encontradas con las dos metodologías no son significativas para el caso de esteroides, alcoholes lineales, eritrodiol y escualeno, constatándose la utilidad y rapidez de esta metodología. En el caso de los tocoferoles las diferencias encontradas entre las determinaciones si son significativas. Una explicación a esta diferencia esta en que para este caso con el método estandarizado, donde se utiliza la cromatografía líquida e inyección directa de la muestra la manipulación de la muestra es nula y el método es muy preciso.

**Tabla 13.** Efecto de la metodología sobre las variables, mediante análisis de la varianza

Variable <sup>a</sup>	Método oficial (n = 3)	Sistemática desarrollada (n = 6)	Efecto del Método <sup>b</sup>
Esteroides	2245,2 ± 30,3	2243,3 ± 71,4	NS
Alcoholes lineales	2853,9 ± 90,0	2601,4 ± 72,7	NS
Eritrodiol	766,4 ± 11,4	820,9 ± 44,1	NS
$\alpha$ -Tocoferol	214,7 ± 30,0	155,4 ± 44,2	*
Escualeno	2542,7 ± 99,8	2716,3 ± 65,7	NS

<sup>a</sup>Los valores están expresados en mg/kg de aceite y corresponden a la media ± la desviación estándar de 3 (métodos oficiales) y 6 determinaciones (sistemática desarrollada).

<sup>b</sup>Análisis de la varianza de los valores de cada variable.

NS Indica que las diferencias en los valores de las determinaciones no son estadísticamente significativas. \* Indica que sí lo son.

En la Tabla 14 se recogen los resultados de los componentes menores insaponificables de los dos aceites empleados en esta experiencia, determinados mediante la sistemática analítica propuesta.

**Tabla 14.** Composición de la fracción insaponificable en los aceites OL y OR empleados en el estudio aplicando la sistemática propuesta (valores expresados en mg/kg).

		OL	OR
ALCOHOLES	C <sub>20</sub> OH	0,00	70,0
	C <sub>22</sub> OH	28,10	488,68
	C <sub>23</sub> OH	0,00	9,09
	C <sub>24</sub> OH	24,18	371,75
	C <sub>25</sub> OH	0,00	39,88
	C <sub>26</sub> OH	53,94	842,51
	C <sub>27</sub> OH	0,00	120,33
	C <sub>28</sub> OH	82,71	911,76
	<b>TOTAL</b>	<b>188</b>	<b>2854</b>
ESCUALENO		<b>2642</b>	<b>2543</b>
ESTEROLES	β-Sitosterol	900,66	3117,30
	Campesterol	27,77	55,39
	Stigmasterol	10,56	45,80
	<b>TOTAL</b>	<b>1120</b>	<b>2245</b>
Eritrodiol	171,16	766,93	
Uvaol	8,91	41,82	
Eritrodiol+Uvaol	180,07	808,74	

## **18. BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPONENTES DEL INSAPONIFICABLE DEL ACEITE DE OLIVA DURANTE EL PERIODO POSTPRANDIAL EN VOLUNTARIOS SANOS Y ENFERMOS.**

Podemos clasificar los resultados obtenidos en este apartado en los tres puntos siguientes que se desarrollan a continuación.

18.1. Estudio de la evolución concentración-tiempo de los componentes menores del insaponificable de TRL de sujetos sanos durante el periodo postprandial comprendido entre las 0 y 6 horas tras ingestas enriquecidas con aceites de OL y de OR

18.2. Estudio de la evolución concentración-tiempo de los componentes menores del insaponificable de TRL de sujetos enfermos afectados por VIH en el periodo postprandial comprendido entre las 0 y 6 horas tras ingestas enriquecidas con aceites de OL y de OR

18.3. Estudio comparativo, entre sujetos sanos y enfermos, de la evolución concentración-tiempo de los componentes menores del insaponificables de TRL en el periodo postprandial tras ingestas enriquecidas con aceites de OL y de OR

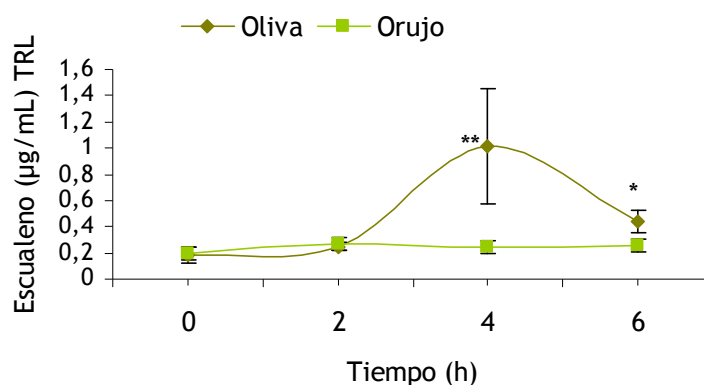
## 18.1. Estudio de los componentes menores del insaponificable de TRL de sujetos sanos

### 18.1.1. Escualeno

El escualeno constituye una sustancia de extraordinaria importancia dentro del metabolismo graso gracias a su papel de precursor de los fitosteroles así como del colesterol en los animales. Es, por otra parte, el hidrocarburo mayoritario presente en los aceites estudiados.

En la Figura 27 se representa la evolución de la concentración de escualeno durante un periodo postprandial de 6h. Según la experiencia llevada a cabo, los resultados obtenidos para el escualeno muestran que dicho compuesto se halla presente en la fracción de las TRL en el grupo de individuos sanos tras la ingesta de los dos tipos de aceites estudiados, OL y OR y que dicha presencia en las TRL es superior cuando la ingesta experimental contenía OL.

La evolución de la concentración tras la ingesta enriquecida con OR permanece prácticamente inalterable entre las 0 y las 6 horas postprandiales con valores comprendidos entre 0,2 y 0,27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TRL, mientras que si analizamos la evolución del mismo utilizando los valores obtenidos tras la ingesta suplementada con OL, se observa un comportamiento monofásico. Así, entre las 2 y las 4 horas se produce un ascenso paulatino situándose el pico máximo a las 4 horas 1.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para ir descendiendo hasta 0.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 6 horas donde se aproxima a los valores del OR 0.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El estudio estadístico de los resultados obtenidos sobre la población sana estudiada muestra ausencia de diferencia significativa entre ellos para un valor de  $P < 0.05$  a las 0, 2, 4 y 6 horas tras las ingestas experimentales. Las diferencias son muy significativas con  $P < 0.0001$  y significativas con  $P < 0.005$  a las 4 y 6 horas respectivamente.



**Figura 27.** Evolución concentración-tiempo de escualeno de TRL de individuos sanos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n = 7-9). \*\* $P < 0.0001$ , \* $P = 0.005$ .

Entre los efectos biológicos del escualeno cabe destacar su potencial efecto como antioxidante (Malecka, 1991) y como protector de regeneración nerviosa (Aguilera et al., 2005). El efecto antioxidante del aceite de oliva ha sido demostrado en estudios con aceites de oliva virgen extra aunque no en estudios sobre aceites de oliva en general (Bogani et al., 2006). Se atribuye esta propiedad antioxidante a la fracción insaponificable, más concretamente a los componentes fenólicos (Visioli et al., 2002) así como al escualeno. Esta función antioxidante se realiza gracias a la reducción de la síntesis de factores proinflamatorios y vasoconstrictores (PGE 2 y TXB 2) por las células endoteliales (Perona et al., 2004). Por otra parte, este hidrocarburo es un potente inhibidor de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima que cataliza la síntesis de colesterol, que sumado a la función antioxidante antes citada, puede estar desempeñando un importante papel en los procesos aterogénicos (Bellosa et al., 2000). También se ha demostrado que la administración del escualeno se ha revelado como un método seguro para corregir la esteatosis hepática y las lesiones ateroscleróticas especialmente en los ratones apo E de género masculino (Guillén et al., 2008).

Y en el campo de la oncología, la presencia de escualeno en la dieta ha mostrado una acción quimiopreventiva frente al cáncer de colon (Newmark, 1999), al inhibir la acción de la HMG-CoA reductasa.

### 18.1.2. Alcoholes alifáticos

Los principales alcoholes alifáticos de los aceites estudiados son los de número de átomos de carbono par, comprendidos entre 20 y 28 átomos de carbono: eicosanol, docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol. Además, hay una pequeña concentración de la serie impar (23, 25 y 27 átomos de carbono). Las cantidades totales encontradas difieren bastante entre ambos aceites 188 y 2854 mg/kg en los aceites OL y OR respectivamente, sin embargo como se observa en la Tabla 15 las cantidades relativas, expresadas como porcentajes sobre el total de alcoholes, son del mismo orden encontrándose el hexacosanol y octacosanol en mayores porcentaje respecto al total.

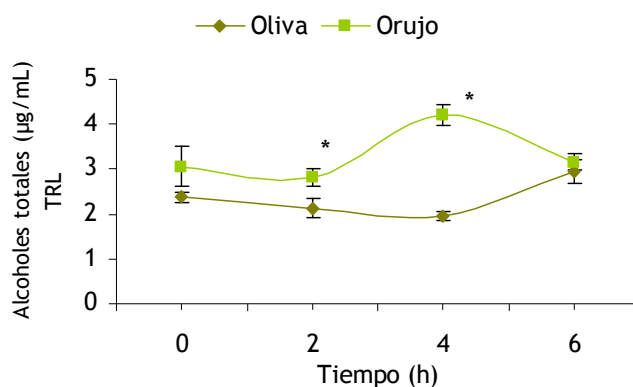
Tabla 15 Composición porcentual de alcoholes lineales en los aceites utilizados

%	OL	OR
C <sub>20:0</sub>	14,9	17,1
C <sub>22:0</sub>	12,8	13,0
C <sub>23:0</sub>	0,0	1,4
C <sub>24:0</sub>	28,6	29,5
C <sub>25:0</sub>	0,0	4,2
C <sub>26:0</sub>	43,8	31,9
C <sub>27:0</sub>	0,0	1,5
C <sub>28:0</sub>	0,0	1,3

La Figura 28 presenta los valores experimentales obtenidos de los alcoholes totales, determinados como suma de los alcoholes C<sub>20:0</sub> a C<sub>28:0</sub>, en la fracción de las TRL en el grupo de voluntarios sanos. Como puede observarse las mayores concentraciones se corresponde cuando la dieta experimental se ha elaborado con OR.

Encontramos diferencias significativas entre ambas curvas a las 2 horas y muy significativa a las 4 horas para un valor de  $P < 0.05$ .

La curva concentración-tiempo para el OR muestra un pico máximo a las 4 horas postprandiales (4,6  $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que para el OL, sufre un pico de inflexión mínima a las 4 horas para después ascender hasta un pico máximo a las 6 horas (3,3  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 28.** Evolución concentración-tiempo de alcoholes totales de TRL de individuos sanos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=7-9). \* $P < 0.05$ .

El interés en alcoholes alifáticos de cadena larga ha sido escaso en comparación con los ácidos grasos, esteroides y fosfolípidos. Los alcoholes grasos han sido habitualmente relegados a un papel de precursores en la biosíntesis de los ésteres grasos y de éteres lipídicos. De hecho, se sabe muy poco acerca de la función biológica de los alcoholes grasos o sus derivados lipídicos, y rara vez se trata en los textos de bioquímica el metabolismo de los alcoholes grasos. No obstante, la reciente identificación de enfermedades humanas derivadas de defectos genéticos del metabolismo de alcoholes grasos ha comenzado a despertar el interés por la importancia de esta oscura clase de lípidos en la biología humana.



### Presencia de los alcoholes grasos y su papel biológico

Los alcoholes grasos constituyen una clase ubicua de lípidos (Mahadevan, 1978). Existen como alcoholes libres o como ésteres grasos y éteres lipídicos al unirse a ácidos grasos y formar así las ceras. En mamíferos los alcoholes grasos libres más abundantes encontrados son tanto saturados como insaturados y con longitud de cadenas de 16 a 20 átomos de carbonos.

Los ésteres grasos están formados por alcoholes grasos esterificados con ácidos grasos y habitualmente muestran una longitud de cadena similar de ácido y alcohol.

Dentro de la cadena biológica alimenticia, los alcoholes grasos como un componente de ésteres grasos pueden encerrar la mayor reserva energética en los animales marinos. Tienen importancia en microorganismos marinos que son fuentes a su vez de energía en la dieta de pescados que se alimentan de ellos. En los tiburones y en ciertos peces, los éteres lípidos neutros y los ésteres grasos sintetizados a partir de alcoholes grasos constituyen la mayoría de lípidos del hígado y de otros tejidos (Malins et al., 1969).

En el caso de las plantas, los alcoholes grasos son sintetizados por éstas e incorporados a las cadenas grasas de las células de las hojas donde actúan como una barrera frente al agua (Eglinton et al., 1967; Kottukudy, 1970). Sin lugar a dudas, los herbívoros dependen en cierta medida para su nutrición de los alcoholes grasos.

En los mamíferos, los alcoholes grasos libres constituyen una pequeña parte de la composición lipídica de la mayoría de los tejidos, normalmente cantidades inferiores a 0,01% del total de la masa lipídica. En comparación con los alcoholes libres, estos lípidos son mucho más abundantes cuando se encuentran esterificados con ácidos grasos. Los lípidos derivados de los alcoholes grasos son particularmente importantes en ciertos tejidos, tales como la piel, cerebro, nervios periféricos, médula

ósea, eritrocitos y corazón. En la piel, los ésteres grasos y el alquildiacilglicerol constituyen el 24% (Nicolaidis, 1967) y el 15% (Oku et al., 1995) de la superficie lipídica de la piel, respectivamente. En la mielina del cerebro humano casi todo el fosfatidil etanolamín (PE) está en la forma del éter plasmalógeno, siendo entre 11-14% del total lipídico (O'Brien et al., 1965).

El papel biológico de los alcoholes grasos y de los lípidos derivados de los alcoholes en mamíferos, con pocas excepciones, se desconoce. Un éter lipídico (1-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolin), comúnmente conocido como factor activador plaquetario, es un potente mediador químico y tiene un papel crucial en la coagulación sanguínea (Hanahan, 1986). Estudios in vitro de células deficientes en plasmalógeno incubadas con ácidos grasos pyrene, sugieren que los éteres lipídicos pueden proteger las membranas biológicas del daño inducido por irradiación ultravioleta (Zoeller et al., 1988). Estos éteres fosfolipídicos pueden también jugar un papel en los procesos de fusión de membrana durante la exocitosis y endocitosis (Lohner, 1996). Los alcoholes grasos con una cadena de carbonos inferior a 14 carbonos tienen propiedades anestésicas bien conocidas que desaparecen cuando la cadena es más larga (Pringle et al., 1981). Los alcoholes grasos, los ésteres grasos y alquilgliceroles de la epidermis, junto con otros lípidos neutros, pueden contribuir a la función barrera frente al agua en la piel y su presencia en el sebo puede procurar una protección a la piel frente a microorganismos y frente a virus con cápsulas lipídicas (Snipes et al., 1977; Kubo et al., 1995). El Hexadecanol ( $C_{16:0}$ -OH) in vitro ha demostrado ser un inhibidor de la actividad de la lipasa (Ferreira, 1990), no obstante, efectos parecidos in vivo no se han demostrado.

### **Origen y metabolismo de los alcoholes grasos en mamíferos**

En mamíferos, los alcoholes grasos están presentes por la ingesta de la dieta y endógenamente son sintetizados a partir de ácidos grasos

(Stetten et al., 1940; Zinder et al., 1970). Sin lugar a dudas, los humanos consumen los alcoholes grasos procedentes de origen vegetal, pero la digestibilidad de los alcoholes grasos libres o de los ésteres grasos (ceras) por el hombre aun no ha sido definida. El consumo proveniente de la dieta de alcoholes de cadena larga y su contribución al pool total de alcoholes grasos en el hombre se desconoce. Una excepción es el fitol (3, 7, 11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) un alcohol graso de origen vegetal de 20 átomos de carbono que no es sintetizado por los mamíferos. El fitol tiene su origen, en parte, en fuentes vegetales y en parte por la descomposición de la clorofila en el intestino, un proceso que tiene escasa relevancia en el hombre pero de fácil formación en rumiantes (Baxter, 1986; Steinberg, 1995). Se ha demostrado que los humanos absorben el fitol de la dieta y que es oxidado a ácido fitánico (Steinberg, 1995).

Las vías que conducen a la síntesis y la oxidación de los alcoholes grasos parecen tener lugar en forma de ciclo (Rizzo et al., 1987). El concepto de un ciclo de alcohol graso deriva del hallazgo de que dentro de una célula intacta, el alcohol graso es simultáneamente sintetizado a partir de ácido graso y oxidado de nuevo a ácido graso, y que las enzimas que catalizan estas reacciones son distintas. Las evidencias que sostienen este ciclo de alcohol graso derivan de la existencia de errores genéticos en humanos del metabolismo de los alcoholes grasos asociados con bloqueos en reacciones específicas. El ciclo del alcohol graso no está cerrado a la entrada de metabolitos intermediarios, tales como lípidos de la dieta o productos resultantes del catabolismo de otros lípidos.

En gran medida los alcoholes grasos son sintetizados a partir de ácidos grasos vía reducción de los ésteres de la acil-CoA (Riendeau et al., 1985). La activación inicial de un ácido graso libre es catalizada por la acil-CoA sintetasa y requiere ATP. La siguiente reducción de acil-CoA es catalizada por acil-CoA reductasa, una enzima NADPH-dependiente, que parece provenir de un aldehído intermediario (Bishop et al., 1981). Esta enzima tiene una longitud de cadena relativamente corta, especificidad

que determina el perfil de las estructuras de los alcoholes (Bishop et al., 1978).

El alcohol graso es utilizado también como sustrato para la síntesis de ésteres grasos y éter lipídicos y es de nuevo oxidado a ácido graso por el alcohol graso: NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa (FAO), un complejo enzimático consistente al menos de dos proteínas separadas que catalizan la oxidación del alcohol graso a aldehído graso y ácido graso (Rizzo et al., 1987; Lee, 1979; Ichihara et al., 1986). El flujo relativo de alcohol graso a través de las vías de biosíntesis son opuestas a las de oxidación a ácido graso, dependen sin lugar a dudas de los índices de síntesis de ésteres grasos y éteres lipídico, los cuales pueden variar de unos tejidos a otros.

Las enzimas involucradas en el metabolismo del alcohol graso parecen estar reguladas de forma coordinada para modular la disponibilidad del alcohol graso para las necesidades de biosíntesis.

Varios pasos enzimáticos en el metabolismo del alcohol graso están localizados en compartimentos subcelulares específicos, aunque los lugares subcelulares para todas las enzimas en un tejido o especies no han sido identificados.

No se sabe si el ciclo del alcohol graso tiene una función auxiliar además de proveer de precursores para la biosíntesis de lípidos o el reciclaje de lípidos. Cada vuelta del ciclo consume una molécula de ATP e intercambia dos moléculas de NADPH por NADH.

En células que poseen un nivel bajo de síntesis de éteres lipídicos y ésteres grasos, el ciclo puede tener una utilidad escasa en la síntesis del alcohol graso y la oxidación (Hue, 1982). El intercambio de equivalentes reductores, sin embargo, puede ser importante para otras reacciones oxidativas-reductivas dentro de la célula.

Diversos estudios sugieren que los alcoholes grasos de cadena muy larga disminuyen los niveles de colesterol plasmáticos en humanos, de forma que la ingesta de 5-20 mg por día de una mezcla de alcoholes, incluyendo

octacosanol (C<sub>28</sub>OH) y triacontanol (C<sub>30</sub>OH), disminuyen el LDL en torno a un 21-29% y elevan el HDL en torno un 8-15% promoviendo además una mejora en la resistencia general del organismo, una mejora en la resistencia al stress y una más rápida recuperación después del ejercicio. El policosanol (C<sub>24</sub>-C<sub>34</sub>), ha demostrado reducir las tasas de colesterol en ensayos clínicos así como la fracción LDL (Fernández et al., 2004; Wang et al., 2003) también han demostrado inhibir la agregación plaquetaria y la peroxidación lipídica, tanto en modelos experimentales como en humanos. En recientes experimentos llevados a cabo in vitro se ha puesto en evidencia la actividad antiinflamatoria que juegan los alcoholes grasos al inhibir y disminuir ciertos mediadores químicos necesarios en la cadena inflamatoria. Y así, se ha podido constatar que estos alcoholes grasos disminuyen la producción de NO, del factor  $\alpha$ -de necrosis tumoral, de prostaglandina E2 y de tromboxano A2 (Fernández-Arche A et al., 2008), todos ellos factores mediadores en los procesos inflamatorios.

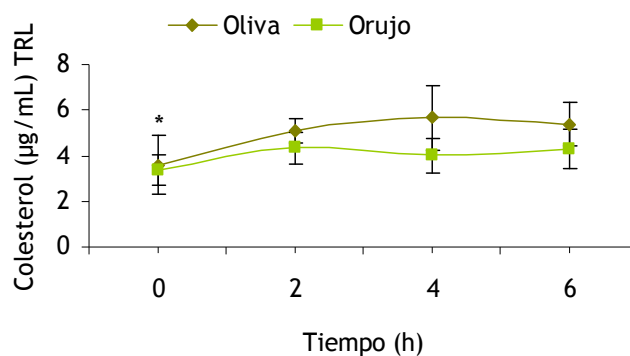
La mayoría de los científicos suponen que la biodisponibilidad de los alcoholes de cadena larga en mamíferos está en torno a un 10-40% de las ceras consumidas (Place, 1992). Si las ceras contienen aproximadamente un 25% de alcoholes de cadena larga, podemos suponer que al menos se necesitaría el consumo de 0.1g de cera natural para alcanzar una dosis efectiva de policosanol en la dieta, aunque los procesos culinarios podrían llevar aparejados una degradación de los constituyentes de las ceras y esto podría explicar por qué las dietas refinadas tienden a producir una elevación del colesterol.

### 18.1.3. Esteroles

#### 18.1.3.1. Colesterol

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el caso del colesterol excepto a las 0 horas, entre las que sí encontramos una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.005$ ) no aparecen diferencias en las cantidades obtenidas para los valores de colesterol en la TRL tanto para ingestas conteniendo, OR como para las que contienen OL.

Las gráficas de los resultados cuantitativos obtenidos tras ambas ingestas se mantienen prácticamente plana a lo largo de todo el periodo postprandial sin picos máximos aunque sí con un progresivo ascenso en la cantidad total de colesterol hasta las 6 horas postprandiales.



**Figura 29.** Evolución concentración-tiempo de colesterol de TRL de individuos sanos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM ( $n=7-9$ ). \* $P < 0.005$ .

Atendiendo a los resultados obtenidos en las experiencias realizadas en el grupo de voluntarios sanos, podemos decir que la presencia de colesterol en la fracción TRL es ligeramente superior cuando la dieta experimental utilizada se ha elaborado con OL que cuando se ha elaborado con OR. La explicación a este hecho podría venir determinada por los niveles más altos de fitosteroles totales presentes en el OR frente al OL tal

y como se verá en las figuras 30 y 32 respectivamente, ya que los fitosteroles juegan un papel importante en el descenso de los niveles de colesterol tal y como se recoge en la bibliografía que posteriormente se cita.

Desde hace tiempo es conocido el papel que desempeña el colesterol dentro de los procesos aterogénicos vasculares y su relación con toda la patología cardiovascular. Hay que recordar que la muerte por patología cardiovascular constituye la causa más frecuente de mortalidad en el mundo desarrollado, de ahí el esfuerzo que se viene haciendo en los últimos años para la comprensión del mecanismo fisiopatológico que desempeña el colesterol en dicha patología.

El colesterol, a pesar de su similitud química con los fitosteroles, presenta una funcionalidad completamente diferente. Los estudios de los últimos años han demostrado cómo los fitosteroles a pesar de que presentan una absorción muy pequeña en relación al colesterol, juegan un papel inhibitor importante en la absorción de éste último. A medida que aumenta la ingesta de fitosteroles desciende más el LDL. El efecto hipolipemiente óptimo se obtendría con ingestas diarias de fitosteroles esterificados entre 1 y 3 g, siendo la reducción de la absorción del colesterol de un 50 %. Sin embargo, si se eleva la ingesta de fitosteroles hasta 9 g, no aumenta la reducción del colesterol, con lo que no tendría sentido introducir mayores cantidades de fitosteroles en la dieta. El mecanismo mediante el cual los fitosteroles disminuyen el colesterol sanguíneo parece ser multifactorial; entre los factores cabe destacar la inhibición de la absorción del colesterol a nivel de intestino delgado limitando la solubilidad en las micelas y disminuyendo la hidrólisis de los ésteres de colesterol en el mismo. La disminución de la absorción intestinal del colesterol inducida por los fitosteroles promueve dos efectos reguladores hepáticos. El primero es el aumento de la síntesis endógena de colesterol, y el segundo la estimulación de la expresión de receptores LDL, con el consiguiente aumento de captación del LDL circulante. El resultado

final es un descenso entre el 10-15% del LDL plasmático. Este descenso del colesterol por los fitosteroles lleva aparejado un efecto antiaterogénico significativo (Moghadasian et al., 1997).

El colesterol es una molécula insoluble, por lo que su absorción intestinal supone una cierta complejidad, siendo el yeyuno proximal la región donde se realiza su absorción pasando a la linfa transportado por las TRL. Son muchas las enzimas y proteínas que participan en la absorción intestinal del colesterol, entre ellas la lipasa pancreática y la carboxyl ester lipasa y aunque no todos los mecanismos han sido elucidados, hasta el momento se han caracterizado la mayoría de pasos en la absorción intestinal del colesterol. Además de la genética, (actualmente se acepta que aproximadamente un 80% del colesterol circulante en el plasma está determinado por el genotipo del individuo) diversos factores fisiológicos (edad, obesidad, velocidad del tránsito intestinal, capacidad detergente de los ácidos biliares en la circulación enterohepática) y dietéticos (tipo y cantidad de grasa, carga de fitosteroles y cantidad de fibra) ejercen una influencia variable sobre la eficiencia de la absorción intestinal del colesterol, en general por interacciones físicas que favorecen o interfieren la formación de micelas mixtas en la fase intraluminal del proceso absorptivo. Los suplementos dietéticos que inhiben la absorción de colesterol son la fibra alimentaria, la lecitina de soja y los fitosteroles.

A la luz de los conocimientos actuales, la disminución de la concentración plasmática de colesterol LDL sería responsable de una disminución de los lípidos contenidos en la placa de ateroma. Hay que mencionar que los lípidos más aterogénicos son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las de muy baja densidad (VLDL). Gracias a la eficacia hipolipemiente de los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, se han podido conseguir reducciones del cLDL de hasta un 50%. La formación de la placa ateromatosa conlleva unos cambios estructurales a nivel del endotelio vascular en los que intervienen la agregación plaquetaria, y activación de los macrófagos plasmáticos.



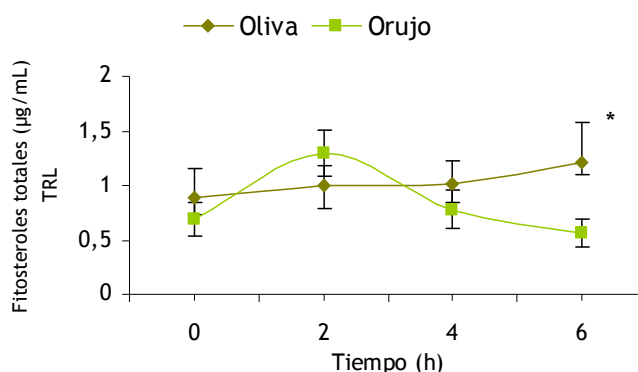
También hay que mencionar que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son las lipoproteínas eficaces en el denominado transporte reverso de colesterol. Esta función consiste en complejos mecanismos que tratan de retirar el colesterol de la pared arterial y de otras células y llevarlo hacia el hígado donde son captadas y catabolizadas para eliminar el exceso de colesterol. Bajos niveles de colesterol HDL, aun en presencia de colesterol total normal, son fuertes indicadores de enfermedad coronaria prematura. El riesgo de enfermedad coronaria a cualquier concentración de colesterol LDL es sustancialmente modificado por las concentraciones de colesterol HDL existentes, no obstante, actualmente se está investigando el beneficio de elevar los niveles de colesterol HDL.

Niveles elevados de colesterol plasmático no solo son el responsable de los fenómenos aterogénicos, sino que además promueven el desarrollo de otras enfermedades, incluyendo ciertas formas de cáncer, diabetes y obesidad.

#### **18.1.3.2. Fitosteroles totales.**

La Figura 30 nos muestra los resultados experimentales en la fracción TRL dentro del grupo de individuos sanos, de la biodisponibilidad de fitosteroles totales, calculados como suma de los esteroides mayoritarios encontrados:  $\beta$ -Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol. Las cantidades iniciales oscilan entre 0,88 y 0,69  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TRL. A lo largo del periodo postprandial podemos apreciar cómo la evolución de esta familia de compuestos en la fracción de las TRL es desigual si comparamos un aceite con otro, ya que entre las 0 y 6 horas la mayor concentración se encuentra cuando la dieta experimental ha sido elaborada con OR, existiendo un pico claramente diferenciado de presencia máxima a las 2 horas. Sobre las 4 horas postprandiales la biodisponibilidad de fitosteroles totales es muy similar tanto si la dieta ha sido elaborada con OL como si ha sido elaborada con OR. En el caso del aceite OL la evolución es levemente ascendente

hasta las 6 horas postprandiales. Es precisamente después de 6 horas desde la ingesta experimental cuando estadísticamente se encuentran las diferencias más significativa entre ambos aceites (1,22-0,56;  $P<0.005$ ).



**Figura 30.** Evolución concentración-tiempo de fitosteroles totales de TRL de individuos sanos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=7-9). \* $P<0.005$ .

La contribución al total de los fitosteroles de cada uno de los considerados es relativamente homogénea a lo largo del periodo postprandial, siendo el  $\beta$ -Sitosterol el mayoritario con una presencia entre el 54,5-59,2% seguido del Estigmasterol: 31,1-21,4% y el menor el Campesterol: 14,4-19,4%.

El estudio de los fitosteroles ha obtenido gran atención por parte de la comunidad científica al haberse demostrado su importante papel en la reducción de la absorción del colesterol plasmático. Una revisión clínica ha demostrado que la reducción promedio en el plasma total y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), fue del 10% y 13% respectivamente, en un total de 590 individuos tratados con fitosteroles (Moghadasian et al., 1999).

Los fitosteroles han llegado a producir una reducción del 50% de las lesiones ateroscleróticas independientemente de la presencia o no de colesterol en la dieta, además del efecto antiaterogénico, debido al

descenso del colesterol, reducción que vendría determinada por las propiedades de los fitosteroles sobre el sistema de coagulación, como antioxidantes y por sus acciones sobre las actividades de la lipasa y lipoproteínas hepáticas (Mohgadasian et al., 1999).

Los fitosteroles sufren un proceso metabólico a nivel hepático para ser transformados en ácidos biliares. No obstante, los efectos beneficiosos de los fitosteroles no se reducen solo al descenso de los niveles de colesterol y por ende en una mejora de las lesiones aterogénicas, sino que además han demostrado experimentalmente inhibir el desarrollo del cáncer de colon. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual esto sucede se ha visto que en tumores inducidos químicamente en animales han demostrado un poder inhibitorio sobre el desarrollo de los mismos.

En cuanto a la absorción intestinal de los diferentes fitosteroles ésta es desigual, así, el campesterol se absorbe mejor que el  $\beta$ -sitosterol (Hamada et al., 2007), mientras que la absorción del estigmasterol es mínima, esto podría ser debido, en parte, a la diferente longitud en sus cadenas, de forma que a mayor número de átomos de carbono menor absorción. La ingesta de  $\beta$ -sitosterol y campesterol produce un incremento plasmático en las concentraciones de los mismos, sin embargo, este incremento es más alto para el campesterol que para el  $\beta$ -sitosterol; esta diferencia no solo es debida a una diferencia en la absorción, sino también al diferente grado de eliminación hepática, ya que al ser el grado de esterificación hepática del  $\beta$ -sitosterol significativamente más bajo que el del campesterol, su eliminación biliar puede ser mayor que la del campesterol. Igualmente la eliminación biliar de los fitosteroles es más rápida que la del colesterol (Lin et al., 1984).

Los mecanismos mediante los cuales los fitosteroles reducen los niveles de colesterol son varios, y así, se han propuesto tres posibles mecanismos de actuación, el primero sería el desplazamiento micelar del colesterol por parte de los fitosteroles a nivel de la luz intestinal siendo excretado por heces el colesterol que no ha podido ligarse a las micelas

por el efecto desplazamiento de los fitosteroles. Un segundo mecanismo sería la disminución de la esterificación del colesterol en los enterocitos al inhibir la actividad de la enzima acilCoA-colesterol-acil transferasa (ACAT), y por último, al estimular el eflujo de colesterol desde los enterocitos hacia la luz intestinal al aumentar la actividad y la expresión de una proteína transportadora.

Estos efectos han llevado a la industria a comercializar el uso de margarinas enriquecidas en fitosteroles y estanoles como alimentos funcionales para reducir el riesgo cardiovascular hasta en un 25% en la población en general.

En cuanto a su posible toxicidad, hasta el momento parece que la administración de fitosteroles en la dieta no implica riesgos para la salud, salvo en el raro caso de desorden metabólico-genético denominado sitosterolemia, en el cual las concentraciones plasmáticas de fitosteroles, particularmente de  $\beta$ -sitosterol, son extremadamente altas. Se hereda como un rasgo autosómico recesivo (Bhattacharyya et al., 1974; Shefer et al., 1994). Una absorción incrementada del  $\beta$ -sitosterol de la dieta y un nivel disminuido en su eliminación se cree que pueda ser el responsable de su acumulación en los tejidos y en el plasma de los individuos afectados.

Los pacientes sitosterolémicos desarrollan xantomas en los tendones, aterosclerosis acelerada (mas pronunciada en varones jóvenes), episodios hemolíticos, artritis y artralgiás. En varios varones jóvenes que murieron de infartos agudos de miocardio se encontró en la autopsia extensas lesiones coronarias y aórticas de aterosclerosis (Rallidis et al., 1998). Se han descrito casos de sujetos sitosterolémicos que tienen una actividad disminuida de la HMG-CoA hepático reductasa y un incremento de los receptores hepáticos LDL (Hobbset al., 1993). No obstante, se ha demostrado recientemente que las actividades tanto de la síntesis enzimática de ácidos biliares, como la esterol 27-hidroxisilasa y la colesterol 7- $\alpha$ -hidroxisilasa están inhibidas en pacientes sitosterolémicos homocigóticos (Marais et al., 2002). Además, un estudio de Honda et al., (1998) sugiere

que el descenso en la síntesis del colesterol en sujetos sitosterolémicos se debe a una baja regulación en la cadena enzimática, intermedia y final de la síntesis del novo colesterol mas bien que a un simple defecto heredado en el gen de la HMG-CoA reductasa. La estructura genética de esta enfermedad se halla en la actualidad bajo investigación (Lee et al., 2001). A través de un estudio con diez familias sitosterolémicas, se ha podido localizar el defecto genético en el cromosoma 2p21, entre los marcadores microsatélites D2S1788 y D2S1352. Posteriormente han excluido el lugar de mutaciones en los genes de la HMG-CoA reductasa, HMG-CoA sintetasa, LDL receptor, proteínas de enlace reguladoras del esterol (SREBP-1y2), acylcoenzimaA:colesterol:acyltransferasa (ACAT) y proteína microsomal transfer triglicerida (MTP) en tres de las familias afectadas (Patel et al., 1998).

Existen otros trabajos realizados in vitro donde se observa que altos niveles de  $\beta$ -sitosterol pueden causar contracción de las células endoteliales del cordón venoso umbilical humano (Boberg et al., 1991). También, la administración subcutánea de  $\beta$ -sitosterol en ratones albinos induce disfunciones a nivel de los órganos reproductivos. Por otra parte, en ensayos clínicos sobre ratas comparando las respuestas en función del tipo de esterol han evidenciado que una dieta enriquecida con  $\beta$ -sitosterol incrementa la síntesis endógena de colesterol, frente a ratas alimentadas con dieta rica en estigmasterol, en las que se produjo una supresión de la síntesis hepática del colesterol (Batta et al., 2006); igualmente se ha demostrado cómo el  $\beta$ -sitosterol induce la apoptosis celular en varias líneas celulares tumorales a través de la activación del ciclo de la esfingomielina (Awad et al., 1998).

Podemos decir, como conclusión de los trabajos estudiados, que durante los últimos 40 años los estudios llevados a cabo confirman que los fitosteroles reducen los niveles de LDL, siendo esta reducción más evidente mediante el consumo de la forma saturada de los mismos, es decir en

forma de sitostanol mejor que  $\beta$ -sitosterol o campestanol mejor que estigmasterol.

### 18.1.3.3. Oxiesteroles

Los principales oxiesteroles encontrados en este trabajo, en las TRL postprandiales de individuos sanos son: Sitostanetriol, 7-Cetocolesterol y Epoxisitosterol. También se determinan, en menor cuantía: Estigmasta-3,5-dien-7-one, Colest-5-en-24one-oxy y Colest-7en-3-ol.

En la Figura 31 se muestra la evolución de oxiesteroles totales durante el periodo postprandial de individuos sanos. Estadísticamente se encuentra una diferencia significativa a las 2 horas entre las ingestas experimentales ( $P < 0.05$ ).

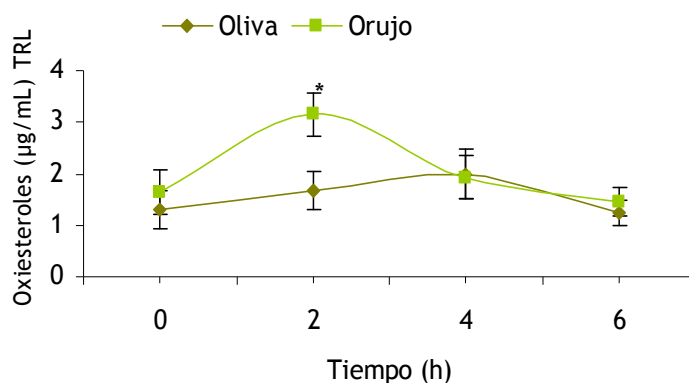


Figura 31. Evolución concentración-tiempo de los oxiesteroles de TRL de individuos sanos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=7-9). \* $P < 0.05$ .

Tanto el colesterol como los fitosteroles pueden ser oxidados dando lugar a diferentes formas oxidadas, en general denominadas oxiesteroles y oxifitosteroles, respectivamente. Poco es lo que se sabe acerca de estos componentes. Algunas formas oxidadas del colesterol pueden ser aterogénicas y citotóxicas y recientemente se ha comprobado que tanto las formas oxidadas de colesterol como las de los fitosteroles son citotóxicas

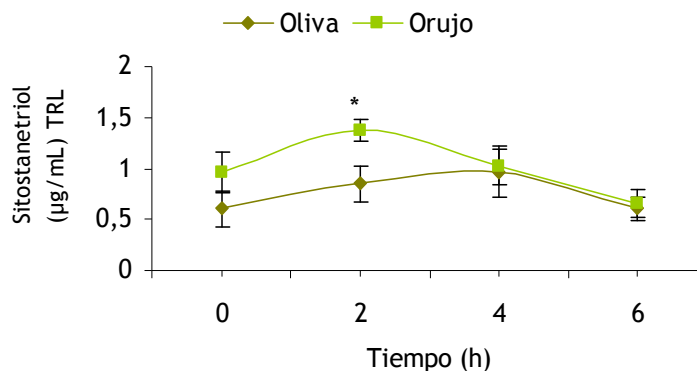
para macrófagos in vitro (Adcox et al., 2001). El sitostanetriol, es un derivado oxidado de esteroides vegetales, encontrándose cifras elevadas del mismo en pacientes enfermos de sitosterolemia (Plat et al., 2001) aunque actualmente no se sabe si estas formas oxidadas pueden afectar a la salud tal y como se piensa de las formas oxidadas del colesterol, las cuales pueden tener dos orígenes, derivados de la dieta o bien de producción endógena. Dada la similitud química entre colesterol y fitosteroides cabe suponer que podrían tener análogas formas oxidadas (Daly, et al., 1983). Los fitosteroides pueden ser oxidados más fácilmente que el colesterol, y así, por ejemplo, el 1.4% de las moléculas de  $\beta$ -sitosterol en pacientes sitosterolémicos estaban oxidadas frente al 0.01% de moléculas de colesterol (Mol et al., 1997), sin embargo, se dispone de poca información acerca de la presencia de oxifitosteroides en la dieta, aunque se han detectado pequeñas cantidades en el café, en las patatas fritas, harina blanca y en aceites vegetales.

Los compuestos oxidados más frecuentemente detectados en plasma de sujetos sanos han sido el sitostanetriol y el  $\beta$ -epoxisitosterol (Grandgirard et al., 2004). En experimentos llevados a cabo en ratas, se ha podido observar que el metabolismo y excreción del sitostanetriol es tal vez más lento que el del resto de los otros compuestos oxidados (Grandgirard et al., 2004).

#### **18.1.3.3.1. Sitostanetriol**

Según los resultados obtenidos en nuestros experimentos podemos decir que en el periodo postprandial tras una ingesta conteniendo tanto OR como aquella conteniendo OL se sigue una trayectoria similar, ligeramente superior en todo el periodo postprandial cuando la dieta experimental ha sido elaborada con OR con un pico máximo a las 2 horas postprandiales en el caso del aceite de orujo y un pico máximo a las 4 horas para el OL, para ir descendiendo las concentraciones en ambos grupos hasta las 6 horas

postprandiales, los valores encontrados oscilan entre (0,60 y 1,37)  $\mu\text{g/mL}$ . Las diferencias, estadísticamente significativa, que hay entre las dos curvas concentración-tiempo, en dietas conteniendo OR y OL, a las 2 h postprandiales ( $P<0.05$ ), no hallándose diferencias significativas para el resto de horas entre ambas curvas.



**Figura 32.** Evolución concentración-tiempo del sitostanetriol de TRL de individuos sanos  $\pm$  SEM (n=7-9). \* $P<0.05$ .

Como ya se ha comentado anteriormente, en relación al sitostanetriol, los productos derivados de la oxidación tanto del colesterol como de los fitosteroles, han sido foco de atención debido a su presencia en las placas de ateromas del ser humano, jugando un papel muy importante dentro de los procesos aterogénicos in vitro y en cierta medida también in vivo. Los compuestos oxidados que se encuentran en mayor cantidad en lesiones ateromatosas avanzadas son el 27-hidroxicolesterol, seguido del 7-cetocolesterol. El papel que juega éste último dentro del desarrollo aterosclerótico aún está por determinarse con exactitud (Lyons et al., 1999); su origen puede ser al parecer tanto endógeno, a través de procesos oxidativos del colesterol endógeno, o bien derivado de la absorción procedente de la ingesta (Nielsen et al., 1995).



### 18.1.3.3.2. 7-Cetocolesterol

El 7-Cetocolesterol parece formarse fundamentalmente mediante procesos oxidativos no enzimáticos a partir del colesterol y concentrarse en las células espumosas tanto en las placas de ateromas como en las plasmáticas.

En nuestro estudio encontramos a las 4 horas postprandiales la máxima concentración de este compuesto (0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en los dos grupos.

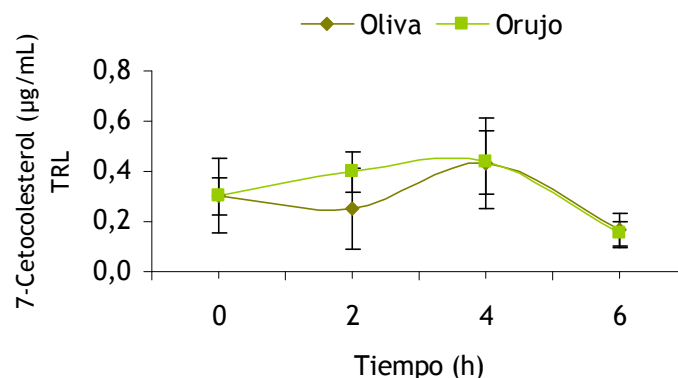


Figura 33. Evolución concentración-tiempo del 7-Cetocolesterol de TRL de individuos sanos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=7-9).

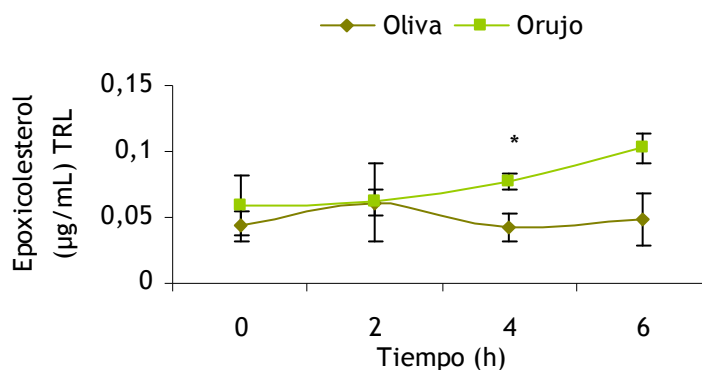
Los efectos *in vitro* causados por este compuesto son una inhibición de la liberación del colesterol por las células, un descenso en la permeabilidad de la membrana celular a la glucosa, alteraciones en el flujo de membrana del ión  $\text{Ca}^+$ , alteraciones de la barrera endotelial, disminución de la expresión de los receptores de LDL, inhibición de la liberación del NO, citotoxicidad, e inducción de apoptosis celular (Lyons & Brown, 1999). En estudios con radioisótopos en ratas ha podido comprobarse cómo el 7-cetocolesterol es rápidamente captado por el hígado, hidrolizado y liberado en forma no esterificada, que

presumiblemente sería excretado vía biliar hacia la luz intestinal (Lyons et al., 1999).

#### 18.1.3.3.3. Epoxicolesterol

Es uno más de los derivados oxidados del colesterol atribuyéndosele las mismas características y efectos aterogénicos que al resto de compuestos oxidativos derivados del colesterol.

Tras analizar los datos obtenidos para el epoxicolesterol correspondientes al grupo de sanos podemos decir que la presencia de dicha sustancia en la fracción de las TRL es superior cuando lo empleado en la dieta ha sido el OR. La única diferencia estadísticamente significativa es a las 4 horas postprandiales con un valor de  $P < 0,05$ .



**Figura 34.** Evolución concentración-tiempo del epoxicolesterol de TRL de individuos sanos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=7-9). \* $P < 0,05$ .

En resumen, en el grupo de sanos estudiados hemos detectado y cuantificado los principales componentes menores del insaponificable presentes en TRL, durante un periodo postprandial de 6 h, tanto tras ingestas conteniendo OR como en las que contienen OL.

Entre los compuestos cuantificados el **escualeno** presenta una biodisponibilidad mayor cuando el aceite ingerido es OL. Por tanto desde un posible punto de vista en relación a la salud, cabría obtener más ventajas con OL que con OR si buscamos los efectos terapéuticos de este compuesto.

En relación al grupo de **los fitosteroles totales** parece haber una mejor y mayor biodisponibilidad cuando se ha utilizado aceite OR en las 4 primeras horas, posteriormente las diferencias son mínimas. Así pues, parece deducirse que el empleo de OR sería más ventajoso que el empleo del OL si lo que pretendemos es una mayor biodisponibilidad de fitosteroles totales.

En cuanto al **colesterol** no se pueden deducir grandes diferencias tanto con uno u otro aceite, por lo que creemos que el uso de OR u OL es indiferente de cara a una reducción significativa del colesterol en TRL.

En el grupo de **los alcoholes totales** resulta evidente la mayor biodisponibilidad de los mismos tras el uso de OR, por lo cual habría que explorar en futuros estudios este hecho para ser utilizado en la regulación de los niveles de colesterol.

En último lugar podemos decir que los tres compuestos oxidados estudiados, **sitostanetriol**, **7-cetocolesterol** y **epoxicolesterol**, muestran mayores valores en la fracción de las TRL cuando hemos utilizado en la dieta experimental OR; sin duda esto constituye un inconveniente desde el punto de vista sanitario, dado que como ya hemos apuntado en el trabajo, los compuestos oxidados del colesterol y de los fitosteroles juegan un papel aterogénico al parecer importante.

En definitiva, si bien parece que el OR posee mayores ventajas frente al OL en el grupo de los alcoholes totales y fitosteroles totales en cuanto a la biodisponibilidad de los mismos y de cara a posibles efectos terapéuticos, se halla en desventaja frente al OL en cuanto a la mayor presencia de compuestos oxidados.

## 18.2. Estudio de la evolución concentración-tiempo de los componentes menores del insaponificable de TRL de sujetos enfermos

### Alteraciones metabólico-lipídicas en enfermos

El grupo de enfermos participantes en estos ensayos se caracterizan por presentar un cuadro clínico multisistémico, con varios órganos y funciones afectados entre ellas las que afectan al metabolismo lipídico. Ya vimos con detalle en la introducción las alteraciones y mecanismos fisiopatológicos implicados en los desórdenes metabólico-lipídicos, que a modo de resumen podríamos estructurar en tres fases, una primera fase asintomática, una segunda fase de síntomas clínicos y una tercera fase de severos trastornos multiorgánicos y metabólicos.

Según un estudio de Rivera et al., 2001, en una primera fase, y antes del comienzo de tratamiento alguno, es común encontrar una hipertrigliceridemia con concentraciones bajas de colesterol y colesterol HDL (hay que recordar que esta disminución del colesterol en las primeras fases es común a cualquier proceso infeccioso inflamatorio en los primeros estadios). La progresión hacia enfermedad sintomática en una segunda fase, lleva aparejada una mayor disminución del colesterol HDL, disminución del colesterol total, elevación de triglicéridos y acumulación de las subclases pequeñas y densas de las LDL. Los niveles de colesterol HDL son menores en pacientes con cuentas bajas de linfocitos CD4 (Zangerle et al., 1994). Todas estas anomalías son una respuesta inespecífica a una infección con repercusión sistémica. La hipertrigliceridemia es atribuible a la disminución de la actividad de la lipasa lipoproteica, debido al acúmulo sanguíneo de sus inhibidores, sin embargo al estar la producción hepática de lipoproteínas muy baja, este hecho limita la gravedad de la hipertrigliceridemia.

Los niveles bajos de colesterol HDL se explican por la menor actividad de la lipasa lipoproteica, enzima responsable de un porcentaje

importante de la síntesis de las HDL. Además, si existen niveles altos de triglicéridos, la hipertrigliceridemia por sí misma es causa de colesterol HDL bajo.

La introducción de las nuevas terapias antirretrovirales ha supuesto una significativa disminución en la morbimortalidad del padecimiento, sin embargo, sus efectos sobre el metabolismo de lipoproteínas, carbohidratos y tejido adiposo son causa frecuente de complicaciones cardiovasculares.

La dislipemia de estos pacientes es multifactorial. El efecto final es una hipertrigliceridemia (moderada a severa, dependiendo del fármaco utilizado) con hipercolesterolemia moderada (<300 g/dL) que es reversible al suspenderse la administración de estos fármacos. A todo esto se suma una lipodistrofia o redistribución anómala de la grasa corporal; la grasa subcutánea en cara y extremidades inferiores disminuye y se deposita en sitios anormales (cuello, en la columna dorso cervical, grasa intrabdominal). Además de estas alteraciones los antirretrovirales son responsables de otras disfunciones como intolerancia a la glucosa con desarrollo de diabetes (la resistencia a la insulina causa alteraciones que favorecen la progresión de la aterosclerosis), acidosis láctica, hiperfibrinogemia, altas concentraciones de proteína C reactiva, apolipoproteína B, disminución de la vasodilatación arterial y aumento del grosor de la íntima de la arteria carótida. La consecuencia esperable de todo ello es la aceleración de los procesos aterogénicos. No obstante, los efectos de los inhibidores de la proteasa (IP) son distintos entre ellos dependiendo del fármaco utilizado; si bien los estudios realizados parecen demostrar la influencia de los IP sobre el metabolismo lipídico, la asociación entre los ITRN (inhibidores de la transcriptasa reversa de tipo nucleósido; habitualmente el tratamiento de los enfermos de VIH suele ser una mezcla de IP con ITRN) y la dislipemia es menos clara y en ausencia de lipodistrofia, ninguno de los ITRN parecen implicados en el desarrollo de dislipemia.

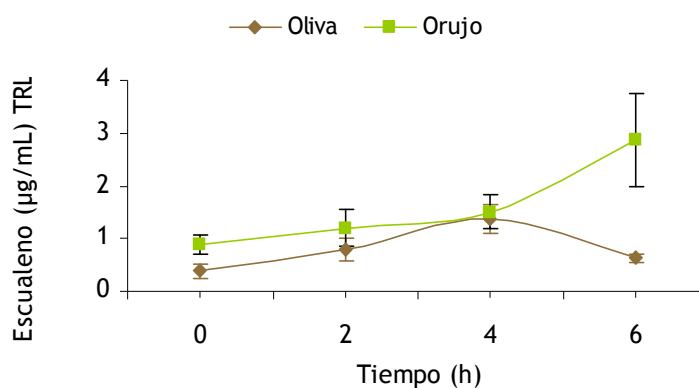
Los factores identificados como predictores de dislipemia varían notablemente entre los estudios. Los más comunes son carga viral baja, CD4 altos, sujetos con recuperación nutricional, preexistencia de dislipemia, diabetes y lipodistrofia, esta última asociada positivamente con la duración de la infección por VIH, siendo otros factores asociados a la misma, la mayor edad, la raza blanca, la duración y severidad de la enfermedad, tiempo desde la reversión de la progresión clínica de la infección y cambios extremos de peso. Los mecanismos por los cuales los IP y los ITRN causan lipodistrofia se desconocen.

El tratamiento de las alteraciones metabólicas incluye terapia nutricional, (los efectos inhibidores de los IP sobre la secreción de las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, Apo B, son revertidos por la acción del ácido oleico) ejercicio y la eliminación de otros factores de riesgo como tabaquismo o alcoholismo; si no se consigue la normalización del perfil de lípidos, se puede utilizar el tratamiento farmacológico.

En cuanto al tratamiento de la lipodistrofia no existe ningún tratamiento eficaz.

### 18.2.1. Escualeno

Los resultados obtenidos para el escualeno en el grupo de enfermos indican que este compuesto también se encuentra en la fracción TRL de este grupo en estudio, con los dos aceites empleados, destacando la presencia ligeramente superior de dicho hidrocarburo cuando la dieta ha sido elaborada con OR (Figura 35). En este caso, como puede apreciarse en gráfico, la concentración del escualeno se dispara a partir de las 4 horas hasta alcanzar un pico máximo a las 6 horas postprandiales (2,86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cuando el grupo de enfermos ingiere OL el pico máximo se alcanza a las 4h (1,27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) postprandiales para ir descendiendo progresivamente hasta las 6 horas (0,64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



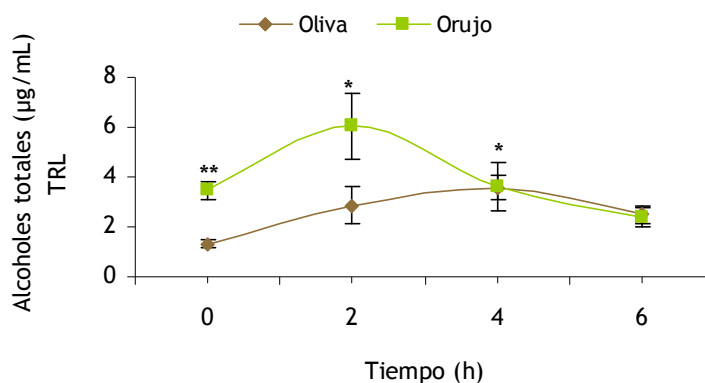
**Figura 35.** Evolución de la concentración-tiempo de escualeno. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11).

### 18.2.2. Alcoholes totales

La presencia de los alcoholes totales en la fracción TRL en el grupo de enfermos viene representada en la Figura 36. Puede observarse que la mayor presencia de alcoholes totales en la fracción TRL se encuentra cuando la dieta ha sido elaborada con OR. En este caso la máxima concentración se produce a las 2 h postprandiales (6,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El análisis



estadístico de los resultados obtenidos muestra, en el caso de los enfermos, una diferencia muy significativa a las 0 horas (1,29-3,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con un valor de  $P<0,05$ , significativa a las 2 y 4 horas para valores de  $P<0,05$  en ambos casos, y una ausencia de diferencia significativa a las 6 horas postprandiales.



**Figura 36.** Evolución de la concentración de alcoholes totales durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.005$ .

En ambas curvas se muestra un ascenso en la concentración de alcoholes totales hasta llegar a un máximo, en el caso de una ingesta conteniendo OR, a las 2 horas postprandiales, para ir disminuyendo hasta llegar a sus valores más bajo a las 6 horas. La curva de los que ingirieron OL es una curva que se inicia con valores más bajos que van aumentando hasta las 4 horas donde comienza un descenso paulatino hasta las 6 horas donde los valores se igualan. En ambos casos las curvas muestran a las 6 horas una concentración de alcoholes totales alta (2,3-2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

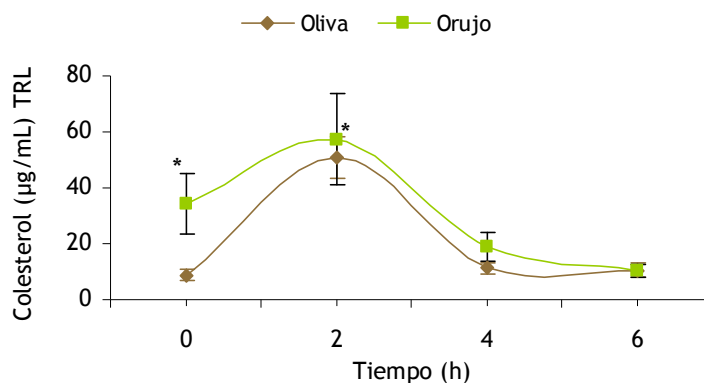
Diversos estudios sugieren, como ya se ha mencionado, la utilidad de los alcoholes de cadena larga en la reducción de los niveles de colesterol, más en concreto la reducción de los niveles de LDL y aumento de los niveles de HDL. Por tanto, el enriquecimiento dietético con alcoholes de cadena larga podría ser también de utilidad a la hora de reducir el riesgo aterogénico en estos enfermos tratados con IP e

hipercolesterolemia, aunque no hemos encontrado nada acerca de las alteraciones metabólicas de los alcoholes alifáticos en estos enfermos.

### 18.2.3. Esteroles

#### 18.2.3.1. Colesterol

En la gráfica 37 se recoge la evolución del colesterol durante el periodo postprandial del grupo de enfermos conteniendo en sus ingestas aceites OR y OL. La importancia de la presencia del colesterol en el grupo de enfermos queda reflejada en dichas curvas. La distribución gráfica de ambas es similar apreciándose un pico máximo de concentración a las 2 horas (50,9-57,3  $\mu\text{g/mL}$ ), para ir descendiendo de forma paralela hasta las 6 horas donde se alcanzan los valores más bajos (10,3-10,4  $\mu\text{g/mL}$ ). Los valores encontrados son ligeramente superiores cuando la dieta experimental ha sido elaborada con OR.



**Figura 37.** Evolución de la concentración de colesterol durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P < 0.05$ .

En dichas gráficas podemos, además, constatar que en este grupo los niveles de colesterol son bastante más altos que en el grupo de sanos,

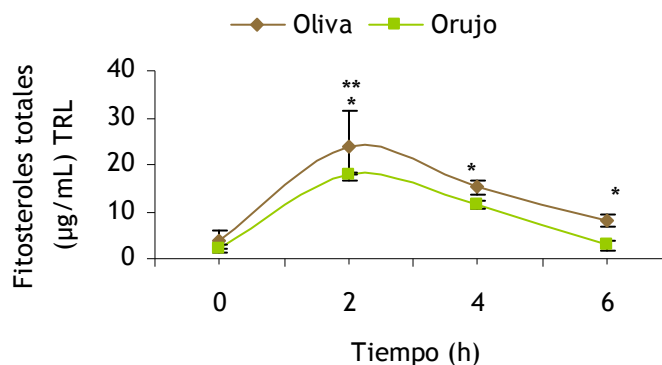
esto se apreciará con mas detalle en el epígrafe dedicado a la comparación entre grupo de sanos y enfermos.

El análisis estadístico de los resultados nos muestra diferencias significativas para las 0 y a las 4 horas con  $P < 0.05$ .

Hay que mencionar que la hipercolesterolemia, que se hace a expensas fundamentalmente de una disminución de la fracción HDL y una elevación de la LDL, es una complicación frecuente en los enfermos de VIH tratados con IP representando un factor de riesgo elevado en el desarrollo de aterogénesis y de lipodistrofia en estos enfermos. Para hacer frente a tales complicaciones se utiliza la administración de estatinas como medicamentos hipocolesterolémicos. Los datos y la evolución encontrada en este estudio está, por tanto, de acuerdo con las alteraciones lipídicas de estos pacientes, en los que uno de los graves efectos secundarios de los agentes terapéuticos utilizados es la elevación de los niveles de colesterol y consecuentemente de la formación de placas de ateroma fundamentalmente a nivel cardiaco.

#### **18.2.3.2. Fitosteroles totales**

En la Figura 38 se muestra la evolución de la concentración total de fitosteroles del grupo de enfermos, durante el periodo postprandial de 6 horas estudiado. En esta concentración total de fitosteroles contribuyen fundamentalmente los esteroides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y  $\Delta^5$ , 24 estigmastadienol. El mayor pico de absorción se produce en ambas ingestas a las 2 horas postprandiales (24,03-17,9  $\mu\text{g/mL}$  para OL y OR respectivamente), descendiendo progresivamente hasta las 6 horas (8,17-2,86  $\mu\text{g/mL}$ ). Estadísticamente encontramos que las diferencias son significativas a las 2 horas con  $P < 0.05$  y muy significativa con  $P < 0.0001$ , a las 4 horas la diferencia es muy significativa con  $P < 0.05$  y finalmente la diferencia es significativa a las 6 horas con  $P < 0.05$ .



**Figura 38.** Evolución de la concentración de fitosteroles totales durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$ .

Podemos decir, por tanto, que los fitosteroles están presentes en el grupo de enfermos estudiado y que su presencia es superior cuando la dieta ha sido elaborada con OL a cuando ha sido elaborada con OR.

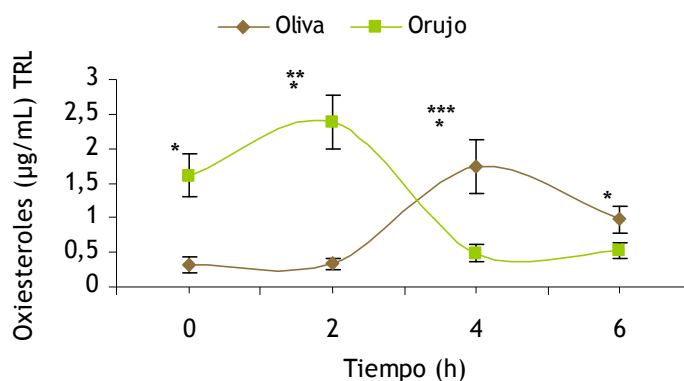
Como ya se ha mencionado, son los fitosteroles, concretamente las formas saturadas, constituyen un factor dietético importante en la reducción de los niveles de colesterol, de ahí que en estos enfermos, que muestran un considerable aumento del colesterol, la administración de compuestos ricos en fitosteroles, de los cuales el más representativo es el  $\beta$ -sitosterol, podría conllevar beneficios a la hora de reducir los niveles de colesterol, además del uso farmacológico ya mencionado de las estatinas.

### 18.2.3.3. Oxiesteroles

La evolución de los oxiesteroles totales, suma de sitostanetriol, 7-cetocolesterol, Colest-5-en-24one, Colest-7en-3ol y epoxicolesterol se encuentra recogida en la Figura 39. Puede observarse que el pico máximo para el grupo que ha ingerido aceite OR se produce a las 2 horas para caer hasta las 4 horas postprandiales donde se encuentran los valores más bajos de cuantificación. En cuanto a la curva de los enfermos que han ingerido

una dieta conteniendo aceite OL muestra un ascenso en el periodo comprendido entre las 2 y 4 horas llegándose al pico máximo a las 4 horas para descender suavemente a partir de ese momento.

El estudio estadístico de los resultados muestra una diferencia significativa a las 0 horas para  $P < 0.05$ , al igual que a las 2 horas para  $P < 0.05$  y muy significativa a  $P < 0.0001$ ; una diferencia significativa a las 4 horas para  $P < 0.05$  y muy significativa cuando  $P < 0.005$  y por último a las 6 horas la diferencia estadística es significativa para  $P < 0.05$ .



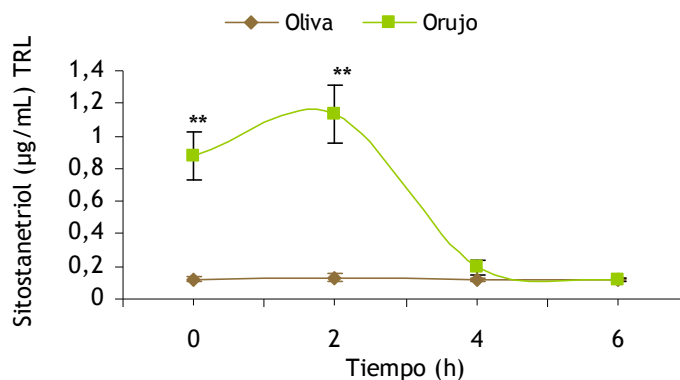
**Figura 39.** Evolución de la concentración de oxisteroles totales durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.005$ .

La evolución de cada uno de estos compuestos oxidados individualmente se describe a continuación.

#### 18.2.3.3.1. Sitostanetriol

En el grupo de enfermos la presencia del sitostanetriol es muy superior cuando se ha utilizado el OR (0,12-1,13  $\mu\text{g/mL}$ ) a cuando se ha utilizado en la dieta experimental el OL (0,12-0,13  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 40).

Los análisis de los resultados encontrados para el sitostanetriol muestra diferencias muy significativas a las 0 y 2 horas  $P < 0.05$ .



**Figura 40.** Evolución de la concentración de sitostanetriol durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P < 0.05$ .

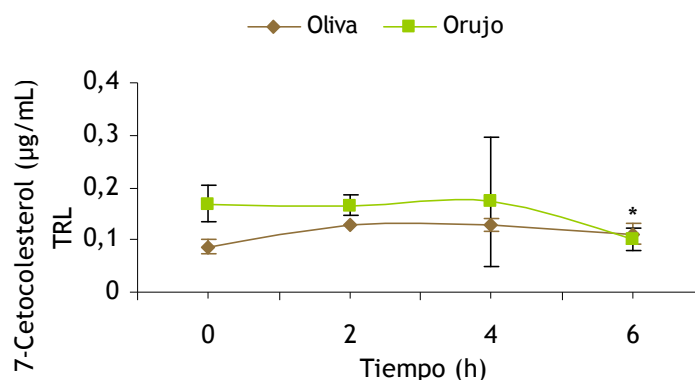
La evolución de la concentración para este esteroide oxidado, en el caso del aceite de oliva, se mantiene lineal en todo el periodo postprandial, sin embargo, la curva para el orujo es muy diferente ya que comienza con valores elevados y su pico máximo se halla a las 2 horas para caer bruscamente hasta las 4 horas a partir de las cuales se mantiene paralela a la del aceite de oliva hasta las 6 horas ( $0,12 \mu\text{g/mL}$ ).

Dado que este es un derivado oxidado del  $\beta$ -sitosterol y del papel aterogénico que juegan los derivados oxidados de los fitosteroles, podemos deducir la importancia de encontrar valores elevados en la concentración de este compuesto y su efecto aterogénico que se sumaría a los ya de por sí elevados valores de colesterol y LDL en los pacientes VIH tratados con IP como ya se ha dicho con anterioridad. Por tanto valores de concentración elevados de sitostanetriol en estos enfermos pueden agravar la situación de riesgo aterogénico que padecen. Hay que mencionar además que el compuesto oxidado más frecuentemente detectado en plasma es precisamente el sitostanetriol (Grandgirard et al, 2004). Según se ve en la gráfica las concentraciones de esta sustancia serían bastante más altas en

el caso de ingesta de aceite de orujo que de oliva, aunque a partir de las 4 horas sus concentraciones son muy similares.

### 18.2.3.3.2. 7-Cetocolesterol

En la Figura 41 se recoge la evolución 7-Cetocolesterol observándose que ambas curvas son muy similares, discurriendo casi paralelas sin que se produzcan grandes picos de concentración ni en el OL ni en el OR. Tan solo se aprecia una diferencia significativa para las 6 horas postprandiales.

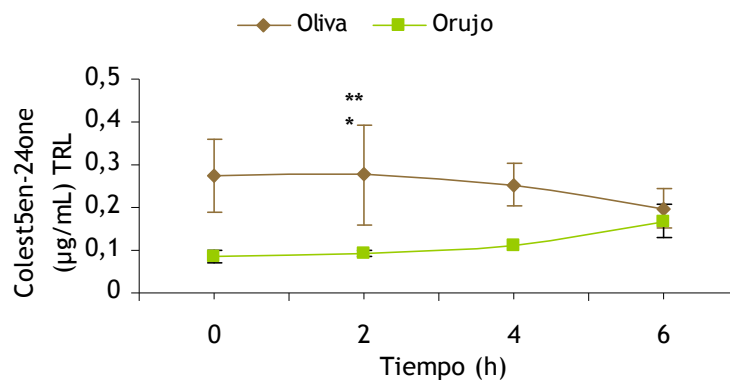


**Figura 41.** Evolución de la concentración de 7-cetocolesterol durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=5-9). \* $P < 0.05$

Al ser este otro compuesto oxidativo derivado del colesterol, jugaría un papel también importante como potenciador de lesiones aterogénicas; por tanto, es importante mantener las concentraciones a niveles bajos para evitar este riesgo. Se observa que las concentraciones de 7-Cetocolesterol son más elevadas cuando se la dieta ha sido elaborada con OR que cuando la dieta experimental ha sido elaborada con OL.

### 18.2.3.3.3. Colest-5-en-24one

Para este oxisterol los resultados encontrados están comprendidos entre 0,27-0,20  $\mu\text{g/mL}$  para ingestas conteniendo OL y entre 0,09 y 0,17  $\mu\text{g/mL}$  cuando la ingesta contiene OR. Las diferencias encontradas son muy significativas a las 2 horas con  $P < 0.0001$ . Ambas evoluciones discurren de forma paralela, siendo mayores para el OL, para al final de las 6 horas de estudio estos coinciden (0,20-0,17  $\mu\text{g/mL}$ ) como se observa en la Figura 42.

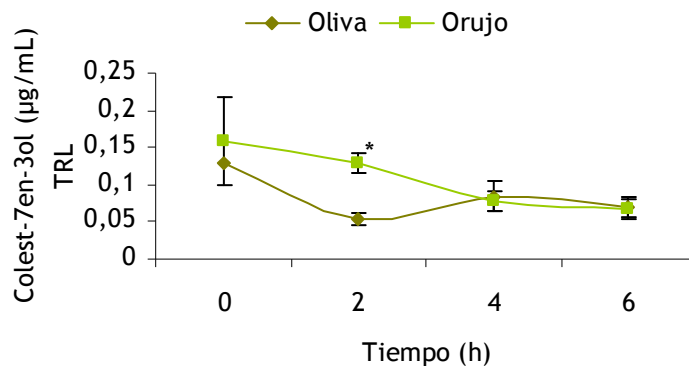


**Figura 42.** Evolución de la concentración de colest5-en-24 one durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$ .



#### 18.2.3.3.4. Colest-7en-3ol

Para esta compuesto de oxidación las dos curvas solo muestran una diferencia significativa para las 2 horas postprandiales.

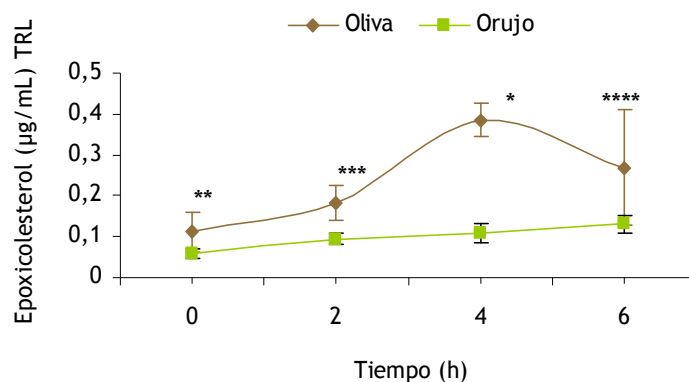


**Figura 43.** Evolución de la concentración del coles-7en-3ol durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P < 0.05$ .

En este caso, los datos recogidos (no está es inicial de los que ingirieron oliva) presentan valores muy similares entre las 4 y 6 horas postprandiales; en el caso del OR comienza con valores elevados para ir disminuyendo su concentración hasta las 6 horas.

#### 18.2.3.3.5. Epoxicolesterol

Los datos recogidos en la gráfica 44, muestran diferencias muy significativas para todos los valores obtenidos durante el periodo postprandial.



**Figura 44.** Evolución de la concentración del epoxicolesterol durante el periodo postprandial estudiado. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM (n=9-11). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P = 0.001$ , \*\*\*\* $P = 0.005$ .

La curva que representa la cuantificación del compuesto cuando la dieta se ha elaborado con OR sube en pendiente suave desde las 0 horas hasta las 6 horas donde alcanza sus valores máximos (0,13  $\mu\text{g/mL}$ ). Cuando se analiza la representación gráfica de la cuantificación utilizando en la dieta experimental OL, vemos que se produce un ascenso importante en los valores entre las 2 y 4 horas, con un pico de máxima concentración (0,38  $\mu\text{g/mL}$ ) para ir luego disminuyendo lentamente hasta las 6 horas.

Por tanto, los datos obtenidos para el grupo de enfermos nos permiten constatar que la presencia del epoxicolesterol es superior en la fracción de las TRL cuando la dieta ha sido elaborada a partir de OL. De esta sustancia puede decirse que al igual que todos los compuestos oxidativos aumenta el riesgo aterogénico en estos pacientes.

En resumen, en el grupo de enfermos estudiado, al igual que en el grupo de sanos visto con anterioridad, hemos detectado y cuantificado los principales componentes menores del insaponificable presentes en TRL, durante el periodo postprandial, tanto tras ingestas conteniendo OR como en las que contienen OL.

Hemos observado que existe una manifiesta mayor biodisponibilidad del **escualeno** cuando la dieta ha sido elaborada a partir de OR. Sin duda alguna este hecho es relevante de cara a fines terapéuticos, no olvidemos los efectos benéficos del escualeno como reductor de factores proinflamatorios vasoconstrictores y cardioprotector. Debemos recordar que se ha informado sobre muerte súbita por infartos agudos en pacientes con VIH, debido a las complicaciones del metabolismo lipídico de estos enfermos tal y como ya hemos dicho a lo largo del trabajo.

Los **alcoholes totales** muestran una mayor biodisponibilidad en la fracción TRL cuando se ha empleado OR. Como ya apuntamos más arriba cuando hacíamos referencia al grupo de sanos, los estudios experimentales parecen apuntar al efecto hipocolesterolémico de estas sustancias, por lo que también en este caso, parece más ventajoso de cara a estos enfermos el uso de OR.

En cuanto al **colesterol**, los resultados son los que cabría esperar en estos enfermos, es decir, un incremento notable del mismo, siendo ligeramente superior cuando la dieta ha sido elaborada con OR, aunque la diferencia con los niveles cuando la dieta ha sido elaborada con OL no es importante, pero dada la problemática de alto riesgo de trastornos lipídicos en estos pacientes, cabe pensar que el uso de OL sería más aconsejable a la vista de los resultados expuestos.

En el grupo de **fitosteroles totales**, podemos decir que existe una clara y mayor biodisponibilidad de estos compuestos cuando la dieta experimental ha sido elaborada con OL. Este hecho es relevante si pensamos que desde un punto de vista terapéutico es importante conseguir

la reducción de los valores de colesterol que como ya hemos dicho a lo largo del trabajo se hallan elevados en estos enfermos. Por tanto, el empleo del OL con fines hipocolesterolémicos en estos pacientes parece que estaría más justificado que el empleo de OR.

En cuanto al grupo de compuestos oxidados, **7-cetocolesterol**, **sitostanetriol** y **epoxicolesterol**, puede decirse que la mayor biodisponibilidad y cuantificación para los dos primeros, aparece tras el uso de OR, mientras que para el epoxicolesterol la mayor concentración se encuentra tras el empleo de OL. También en el caso de los compuestos oxidativos parece que el empleo de OR es menos ventajoso que el de OL si tenemos en cuenta el efecto aterogénico de dichos compuestos, si además, como ya sabemos, la oxidación de los derivados de los fitosteroles es más fácil que la oxidación de los derivados del colesterol, y el sitostanetriol es un derivado oxidado de los fitosteroles, se confirmaría aún más las ventajas del OL.

Si en el grupo de sanos, el uso de OR parecía reportar más beneficios que el OL, en el grupo de enfermos con VIH los datos obtenidos parecen indicar que las ventajas terapéuticas están más de parte del OL que del OR.

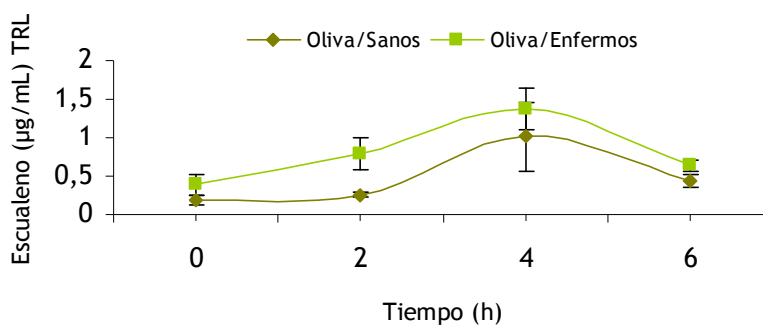
### **18.3. Estudio comparativo de los componentes menores del insaponificables entre sujetos sanos y enfermos de TRL**

Se analizan a continuación las respuestas comparativas sanos-enfermos ante la ingesta de dietas conteniendo OL y OR, cuantificando los diferentes componentes del insaponificable de las TRL y evaluando si se producen diferencias estadísticamente significativas en el periodo postprandial comprendido entre las 0 horas y 6 horas en ambas poblaciones.

#### **18.3.1. Escualeno**

##### **A. Escualeno-oliva**

La biodisponibilidad del escualeno en TRL se muestra en la Figura 45 donde puede verse que cuando la ingesta contiene OL los valores obtenidos son superiores en el grupo de enfermos en comparación con los sanos. En ambos casos, el pico de máxima cuantificación se produce a las 4 horas postprandiales (1,01-1,37  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para sanos y enfermos respectivamente). Las diferencias encontradas entre cada uno de los puntos de dicha gráfica no son significativas estadísticamente.

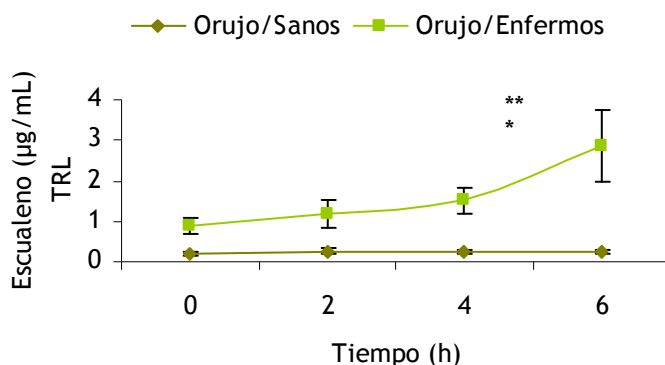


**Figura 45.** Evolución de la concentración del escualeno durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OL. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

### B. Escualeno-orujo

En el caso de ingestas conteniendo aceite de orujo (Figura 46) la biodisponibilidad del escualeno la encontramos superior en el grupo de los enfermos en comparación con el grupo de sanos y las diferencias muestran ser significativas entre ambas curvas para 4 y 6 horas postprandiales  $P < 0.05$  y muy significativa para  $P < 0.0001$ .

Si comparamos ambas gráficas del escualeno, Figuras (45 y 46), la biodisponibilidad del escualeno, cuando se trata de sujetos sanos es superior utilizando OL, sin embargo, en el grupo de enfermos, la biodisponibilidad es mayor cuando lo empleado es el OR.



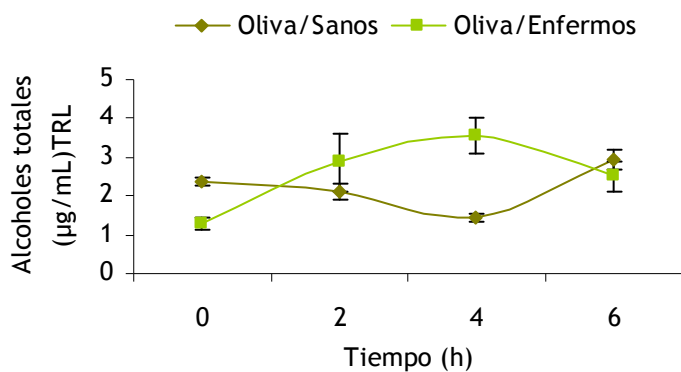
**Figura 46.** Evolución de la concentración del escualeno durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$ .

De los resultados anteriores cabría suponer, y dadas las propiedades antioxidantes, cardioprotectoras e hipocolesterolémicas que posee el escualeno, que sería interesante desde un punto de vista terapéutico obtener unos niveles de presencia del escualeno que pudiera tener una acción terapéutica eficaz frente a las complicaciones aterogénicas de estos enfermos; según los resultados arriba expresados, y a manera de hipótesis de trabajo, una dieta elaborada con aceite de orujo o enriquecida con dicho aceite conllevaría una mayor biodisponibilidad de esta sustancia en los paciente de VIH.

### 18.3.2. Alcoholes totales

#### A). Alcoholes totales-oliva

La Figura 47 recoge la evolución de los alcoholes totales en ambos grupos de voluntarios, sanos y enfermos, cuando sus dietas son suplementadas con OL. Se puede observar cómo la presencia de alcoholes es superior en el grupo de enfermos 1,29-3,55 ( $\mu\text{g/mL}$ ) TRL aun cuando al final del periodo postprandial estudiado obtenemos los mismos resultados.

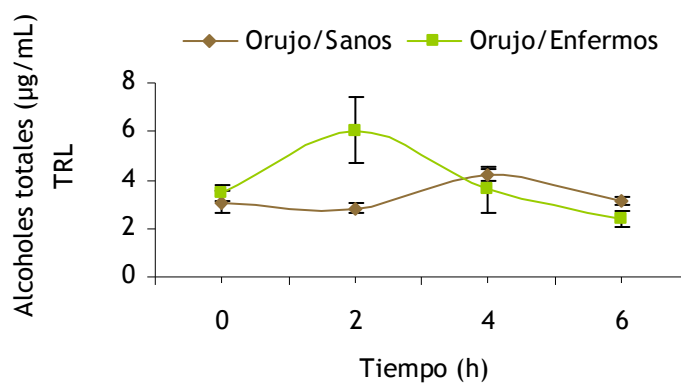


**Figura 47.** Evolución de la concentración de alcoholes totales durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OL. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

### B. Alcoholes totales-orujo

Cuando la dieta experimental se ha realizado con OR la presencia de alcoholes en la fracción TRL es superior en el grupo de enfermos al de sanos, como se ve en la Figura 48. Los picos de máxima concentración durante el periodo postprandial están desplazados en ambas poblaciones. Así en el grupo de enfermos lo presenta después de 2 h mientras que es después de 4 h cuando la concentración es máxima en la población de sanos.





**Figura 48.** Evolución de la concentración de alcoholes totales durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

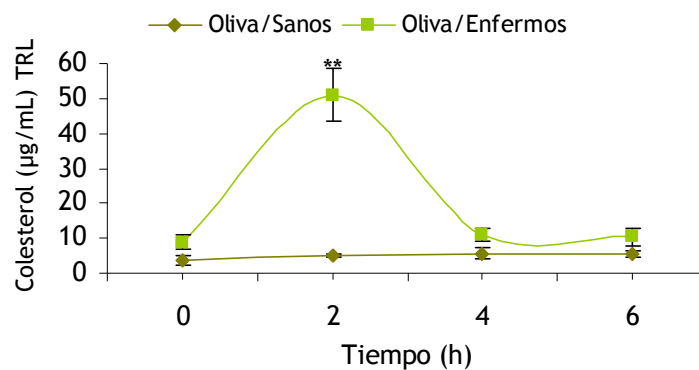
En la literatura consultada no hay nada que haga referencia a la influencia de los alcoholes sobre las alteraciones metabólicas de los enfermos de VIH. Tan solo se pone de relieve el papel que juega este tipo de compuestos inhibiendo ciertos mediadores en la cadena inflamatoria, y su papel como agentes hipocolesterolémicos.

### 18.3.3. Esteroles

#### 18.3.3.1. Colesterol

##### A. Colesterol-oliva

Se muestran diferencias muy significativas para las curvas del colesterol-oliva entre sanos y enfermos (figura 49).



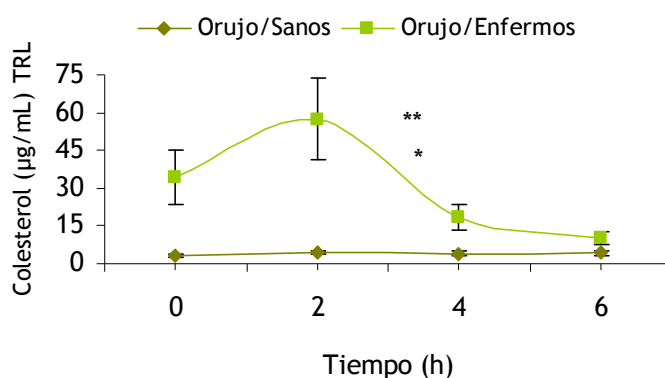
**Figura 49.** Evolución de la concentración de colesterol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.0001$ .

Si nos fijamos en los datos recogidos en la Figura 49, que refleja los resultados obtenidos para el colesterol tras una ingesta elaborada con OL en ambos grupos de estudio, sanos y enfermos, podemos decir que los niveles de colesterol son muy superiores en el grupo de enfermos comparados con los de los sanos, lo cual está de acuerdo con lo que ya dijimos anteriormente sobre las alteraciones de esta sustancia en los enfermos de VIH.

### B. Colesterol-orujo

En el caso del colesterol, puede observarse que la concentración del mismo en el grupo de sanos, tanto si se utiliza aceite de oliva como de orujo, es muy similar y muy baja en ambas gráficas; mientras que en el grupo de enfermos también las gráficas del colesterol, tanto en oliva como en orujo, muestran una representación similar, siendo su cuantificación bastante superior al grupo de sanos y produciéndose el pico máximo tanto en un aceite como en otro a las 2 horas, lo cual está acorde con lo que ya sabemos de que los enfermos de VIH en tratamiento con antirretrovirales

presentan una hipercolesterolemia asociada a su tratamiento farmacológico.



**Figura 50.** Evolución de la concentración de colesterol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$ .

Se aprecian diferencias significativas para las curvas del colesterol-orujo entre sanos y enfermos con  $P < 0.05$  y muy significativa con  $P < 0.0001$  (figura50).

### 18.3.3.2. Fitosteroles totales

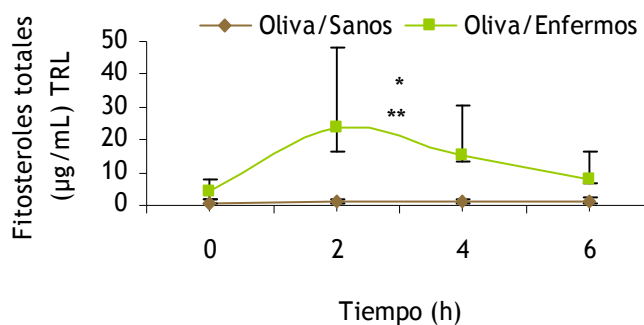
#### A. Fitosteroles totales-oliva

En el caso de los fitosteroles totales la curva que representa la cuantificación de la biodisponibilidad en el aceite de oliva, se mantiene prácticamente constante a lo largo de todo el periodo postprandial en el grupo de los sanos a diferencia de la de los enfermos que presenta un pico máximo a las 2 horas, sin embargo cuando se utiliza orujo vemos que las curvas son más similares en cuanto a los valores de cuantificación registrados. Destaca la diferente cuantificación de los fitosteroles en el

grupo de los sanos puesto que con OL es muy baja, mientras que con el OR se obtienen mayores valores.

También la cuantificación registrada en el grupo de sanos cuando se utiliza OL es superior a la registrada cuando se utiliza OR.

Estadísticamente encontramos una diferencia muy significativa para  $P < 0.0001$  y significativa con  $P < 0.05$  (Figura 51).



**Figura 51.** Evolución de la concentración de fitosteroles totales durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OL. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$

### B. Fitosteroles totales-orujo

Cuando la dieta se ha basado en el OR (figura 52), puede apreciarse que la diferencia en la presencia de los fitosteroles totales en sanos y enfermos, es poco apreciable, dado que las representaciones gráficas de ambos grupos muestran curvas casi superpuestas.

Dado que los fitosteroles juegan un papel demostrado en la reducción del colesterol en sangre sería interesante que los enfermos de VIH mantuvieran una presencia de fitosteroles en sangre adecuada para rebajar los niveles de colesterol.

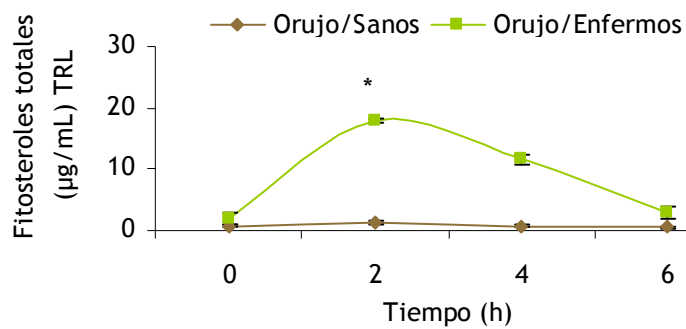


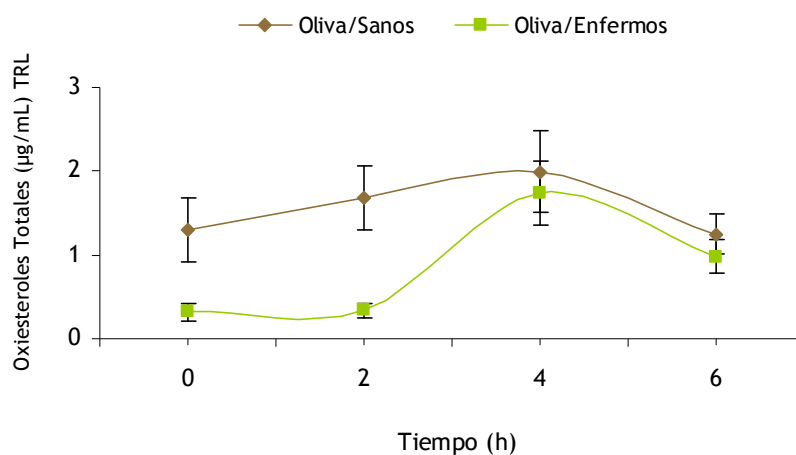
Figura 52. Evolución de la concentración de fitosteroles totales durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \* $P=0.0001$ .

Para los fitosteroles totales procedentes del aceite de orujo encontramos una diferencia muy significativa cuando  $P=0.0001$  (figura 52).

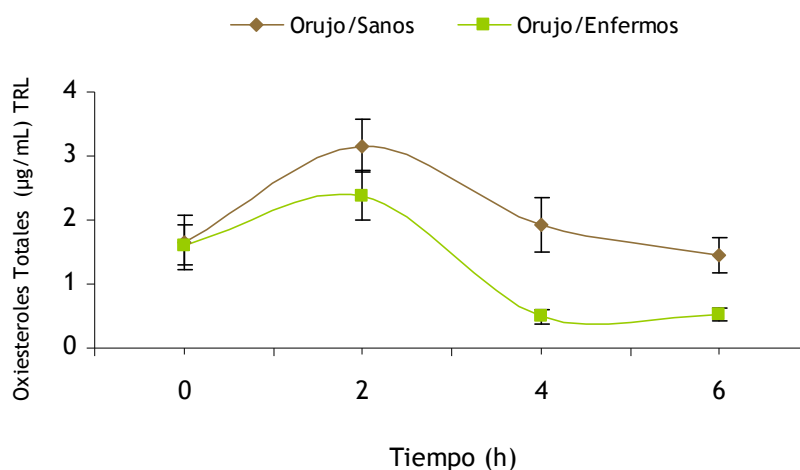
### 18.3.3.3. Oxiesteroles

Tanto en los voluntarios sanos como enfermos que ingirieron los dos aceites, no se observa una diferencia estadísticamente significativa, aunque se observa una cantidad mayor de los oxiesteroles totales en los voluntarios sanos que tomaron aceite de oliva con respecto al aceite de orujo (Figura 53 y 54).

#### A. Oxiesteroles-Oliva



**Figura 53.** Evolución de la concentración de oxiesteroles totales durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OL. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

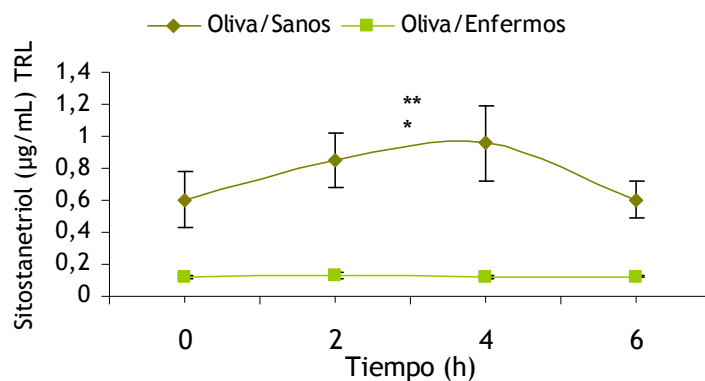
**B. Oxiesteroles-Orujo**

**Figura 54.** Evolución de la concentración de oxiesteroles totales durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

**18.3.3.3.1. Sitostanetriol****A. Sitostanetriol-oliva**

Se aprecian diferencias muy significativas entre ambas curvas de sanos y enfermos (figura 55).

En el caso del sitostanetriol la curva de cuantificación en los enfermos es prácticamente plana, mientras que dichos valores son notablemente altos. En la curva del grupo de sanos; esto podría tener consecuencias favorables desde el punto de vista terapéutico para el grupo de enfermos ya que esta sustancia al ser potencialmente oxidativa y aumentar por tanto el riesgo aterogénico, tiene unos niveles bajos de cuantificación en dicho grupo de enfermos.



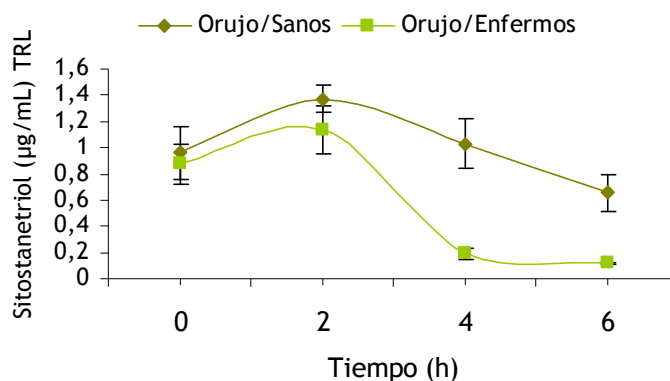
**Figura 55.** Evolución de la concentración de sitostanetriol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OL. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$ .

Si ahora estudiamos la presencia del sitostanetriol en la fracción TRL proveniente del aceite de oliva en ambos grupos, sanos y enfermos, vemos según la (figura 55) que su presencia en el grupo de sanos es mayor a la del grupo de enfermos.

### B). Sitostanetriol-orujo

En el caso del aceite de orujo observamos en la gráfica (Figura 56), que los valores para el grupo de sanos y enfermos son más similares. No hay diferencias significativas entre ambas curvas para el sitostanetriol. En el grupo de enfermos se alcanza el mayor pico a las 2 horas, al igual que en el grupo de sanos. En cualquier caso, en ambos grupos los valores cuantificados en las 2 primeras horas, tanto en sanos como en enfermos, son superiores cuando se utiliza OR en vez de OL.





**Figura 56.** Evolución de la concentración de sitostanetriol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

Por otro lado la presencia del sitostanetriol en sanos y enfermos cuando se ha utilizado en la dieta experimental OR es mayor en el grupo de sanos también que en el de enfermos.

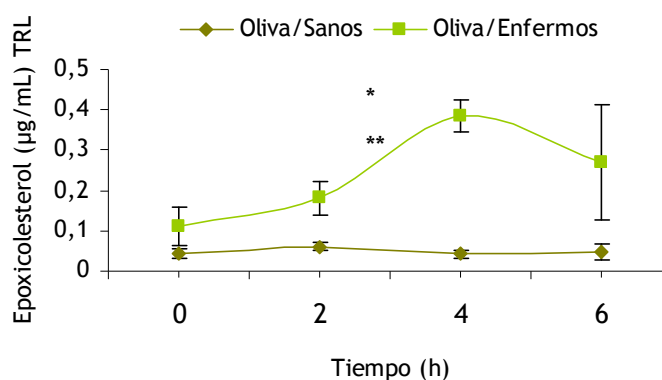
En la literatura especializada sobre las alteraciones del metabolismo de los lípidos en enfermos de VIH, no hemos podido encontrar nada referente a las alteraciones del metabolismo de los compuestos oxidados derivados de los fitosteroles como es el caso del sitostanetriol.

### 18.3.3.3.2. Epoxicolesterol

#### A. Epoxicolesterol-oliva

A continuación vamos a analizar los datos experimentales que hemos encontrado sobre la presencia del epoxicolesterol en ambos grupos de estudio, sanos y enfermos, cuando se ha utilizado la dieta basada en el OL. Los datos recogidos en la Figura 57 muestran diferencias significativas entre los datos postprandiales de ambos grupos con niveles significativos  $P < 0.05$  y muy significativos con  $P < 0.001$ . La diferencia entre ambas curvas es notoria para este oxiesterol; vemos que la presencia de epoxicolesterol

en los enfermos es muy superior al grupo de los sanos, lo cual estaría de acuerdo con el hecho ya apuntado de que estos enfermos poseen una hipercolesterolemia, y que el epoxicolesterol es una sustancia oxidativa derivada de la oxidación del colesterol. La curva de los datos correspondientes al grupo de sanos es prácticamente una línea en todo el periodo en comparación con la del grupo de enfermos donde encontramos un pico máximo de cuantificación a las 4 horas postprandiales. Al ser el epoxicolesterol una sustancia oxidativa estos valores agravarían la situación de riesgo aterogénico de estos enfermos.

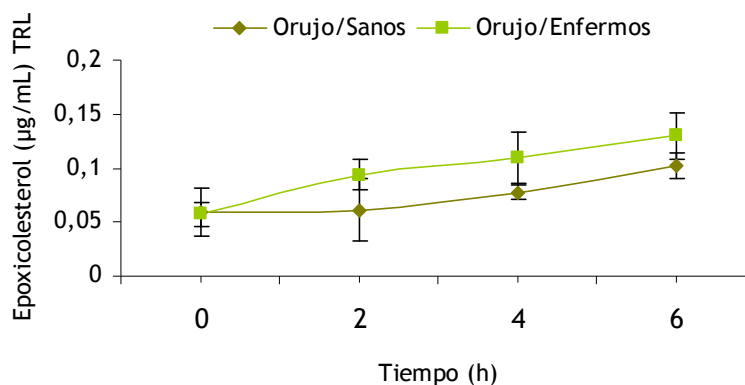


**Figura 57.** Evolución de la concentración de epoxicolesterol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OL. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ .

## B. Epoxicolesterol-orujo

Si analizamos los resultados tras haber elaborado la dieta con OR, vemos que la diferencia de presencia del epoxicolesterol en la fracción de las TRL es menor, si comparamos el grupo de sanos con el de enfermos. No obstante, es ligeramente superior la presencia de dicho compuesto en el grupo de enfermos, como ya hemos explicado más arriba, debido a las elevadas cifras que de colesterol poseen estos enfermos, lo cual parece que conllevaría también un mayor grado de oxidación del mismo. Este

hecho no hace más que agravar la situación de riesgo aterogénico de estos pacientes ya que los derivados oxidativos del colesterol entrañan el mismo riesgo o más que la sustancia de la que derivan.



**Figura 58.** Evolución de la concentración de epoxicolesterol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

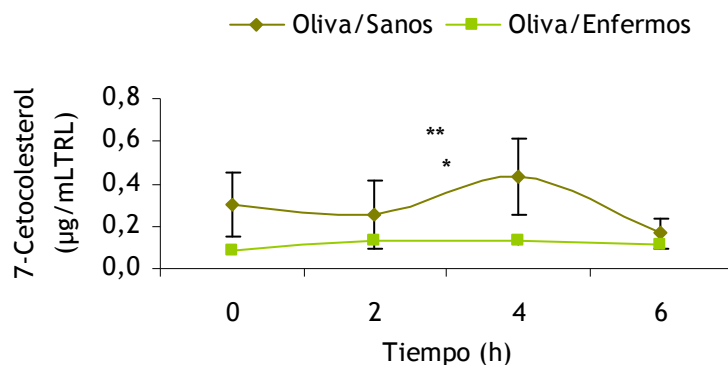
El pico máximo se cuantifica en ambos grupos al final del periodo estudiado (0,10-0,13  $\mu\text{g/mL}$ ). Estos valores son inferiores a los obtenidos con el aceite de oliva tanto en sanos como en enfermos (máximo 0,38 a las 4h para enfermos). Las diferencias encontradas en este caso no son estadísticamente significativas.

### 18.3.3.3.3. 7-Cetocolesterol

#### A). 7-Cetocolesterol-oliva

En el caso del oxisterol 7-cetocolesterol, la gráfica correspondiente (Figura 59) al grupo de sanos que ingirieron oliva ha mostrado ser ligeramente superior al grupo de enfermos que ingiere el mismo aceite, con un pico de máxima concentración a las 4 horas

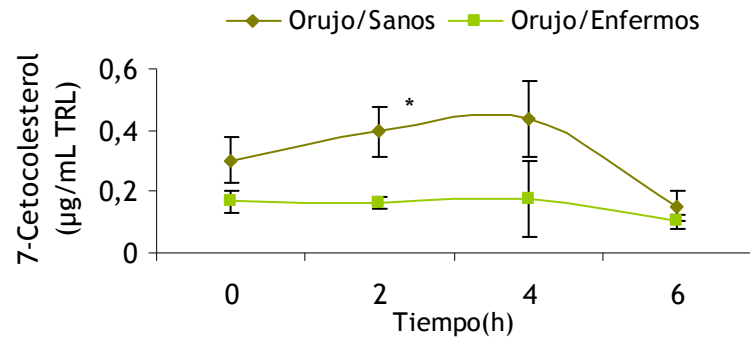
postprandiales con diferencias significativas al correspondiente grupo para las misma hora.



**Figura 59.** Evolución de la concentración de 7-cetocolesterol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OL. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### B. 7-Cetocolesterol-Orujo

Al igual que lo encontrado para el grupo de sanos y enfermos que ingieren OL encontramos ahora cuando ingieren OR que los valores para sanos son superiores a los encontrados para los enfermos con un máximo también a las 4 horas postprandiales. Las diferencias encontradas son significativas para un nivel  $P < 0.05$  (Figura 60).



**Figura 60.** Evolución de la concentración de 7-cetocolesterol durante el periodo postprandial estudiado comparando los grupos de sanos y enfermos cuando la dieta contiene aceite OR. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

De la comparación de datos experimentales entre sanos y enfermos para cada uno de los compuestos del insaponificable y su presencia en la fracción TRL, podemos destacar lo siguiente:

El **escualeno** en la fracción de las TRL tiene una mayor biodisponibilidad en el grupo de los enfermos, tanto si proviene este escualeno tras una ingesta conteniendo OL como si proviene del OR. La consecuencia terapéutica de esto es interesante de cara a aprovechar los beneficios del escualeno.

En cuanto al grupo de **los alcoholes totales**, también podemos decir que la biodisponibilidad en el grupo de los enfermos es superior a la del grupo de los sanos, hecho también importante de cara a la reducción de los niveles de colesterol en estos pacientes

En cuanto al **colesterol** éste se encuentra en concentraciones muy elevadas en el grupo de los enfermos con respecto a los sanos tanto con el consumo de OL como tras el consumo de OR, por las alteraciones ya comentadas del colesterol en estos pacientes.

De los **fitosteroles totales** podemos sacar la conclusión de que cuando este grupo de compuestos provienen de ingestas conteniendo OL su mayor biodisponibilidad se aprecia en el grupo de los enfermos, mientras que si los fitosteroles proceden de ingestas conteniendo OR, su biodisponibilidad es similar en ambos grupos enfermos y sanos.

Y por último, y en relación al grupo de los compuestos esteróicos oxidados, **sitostanetriol** y **epoxicolesterol**, cabe deducir que con respecto al primero, su mayor biodisponibilidad aparece en el grupo de sanos, mientras que es inferior en el grupo de enfermos en ambos aceites estudiados, y en el cuanto al segundo, epoxicolesterol, sucede lo contrario, la mayor concentración del compuesto, en los dos aceites estudiados, se halla en los sujetos enfermos siendo este hecho un factor de agravación aterogénica en estos pacientes tal y como ya hemos comentado.

En resumen, podemos decir que existe una mayor biodisponibilidad en el grupo de enfermos para el escualeno, el  $\beta$ -sitosterol y los alcoholes totales, todos ellos compuestos que reducen los niveles de colesterol en sangre y por tanto sería interesante que futuros estudios pudieran sacar datos terapéuticos a este respecto.

En cuanto a los fitosteroles totales, y los compuestos oxidados, la situación entre sanos y enfermos es más equilibrada y la biodisponibilidad de los mismos se reparte en ambos grupos estudiados.

## 1) En relación a la sistema analítica

Se ha puesto a punto una sistemática analítica para la cuantificación de los principales grupos de compuestos del insaponificable de aceites.

- 1.1. Se ha aplicado a aceites de orujo y oliva y la comparación de los resultados con los obtenidos mediante los procedimientos clásicos ya establecidos demostrando la utilidad y rapidez de esta metodología.
- 1.2. Se ha aplicado la nueva metodología a lipoproteínas ricas en triglicéridos de humanos en el periodo postprandial, tras la ingesta de aceites de orujo y oliva, para determinar la biodisponibilidad de las componentes del insaponificable de dichos aceites.

## 2) En relación a los estudios realizados con lipoproteínas en el grupo de voluntarios sanos

Se han detectado y cuantificado los principales componentes menores del insaponificable en la fracción de las TRL, tanto en sujetos alimentados con aceite de orujo como en aquellos que ingirieron aceite de oliva y su biodisponibilidad durante el periodo postprandial aquí estudiado ha resultado como sigue:

- 2.1. La biodisponibilidad del **escualeno** es mayor cuando el aceite ingerido es oliva.
- 2.2. Tanto **fitosteroles** como alcoholes totales muestran mayor biodisponibilidad cuando el aceite utilizado es el de orujo.
- 2.3. En relación al **colesterol** no hay grandes diferencias en relación a las ingestas conteniendo uno u otro aceite.
- 2.4. Los tres compuestos oxidados cuantificados, **sitostanetriol**, **7-cetocolesterol** y **epoxicolesterol**, muestran mayor concentración en la fracción de las TRL cuando se ha utilizado en la dieta experimental el aceite de orujo.



### 3) En relación a los estudios realizados con el grupo de enfermos

- 3.1. Se observa mayor biodisponibilidad del **escualeno y alcoholes totales** cuando la dieta ha sido elaborada a partir del aceite de orujo.
- 3.2. **Fitosteroles**, muestran una clara y mayor biodisponibilidad cuando la dieta experimental ha sido elaborada con el aceite de oliva.
- 3.3. El **colesterol**, muestra un incremento notable, la diferencia es ligeramente superior, pero no con significación estadística cuando la dieta ha sido elaborada con el aceite de orujo.
- 3.4. En cuanto al grupo de compuestos oxidados, **7-cetocolesterol**, **sitostanetriol** y **epoxicolesterol**, los resultados no muestran la misma tendencia en todos los casos. Encontramos mayor biodisponibilidad para los dos primeros tras la ingesta de aceite de orujo, mientras que para el epoxicolesterol la mayor concentración se encuentra tras el empleo de oliva.

### 4) La comparación de los datos obtenidos para los grupos de sanos y enfermos nos ha permitido concluir

- 4.1. **Escualeno, colesterol,  $\beta$ -sitosterol y alcoholes totales** muestran mayor biodisponibilidad en el grupo de los enfermos, tanto si ingieren OL como si ingieren OR.
- 4.2. **Fitosteroles totales** muestran mayor biodisponibilidad en el grupo de enfermos cuando ingieren OL, mientras que la biodisponibilidad es similar en ambos grupos enfermos y sanos cuando ingieren OR.
- 4.3. El **sitostanetriol** tiene mayor concentración que **epoxicolesterol**, en el grupo de sanos mientras que es inferior en el grupo de enfermos con ambos aceites estudiados.

- Abia R, Perona JS, Pacheco YM, Montero E, Muriana FJ, Ruiz-Gutierrez V. Postprandial triacylglycerols from dietary virgin olive oil are selectively cleared in humans. *J Nutr.* 1999; 129, 2184-91.
- Abia R, Pacheco YM, Perona JS, Montero E, Muriana FJ y Ruiz-Gutiérrez V. The metabolic availability of dietary triacylglycerols from two high oleic oils during the postprandial period does not depend on the amount of oleic acid ingested by healthy men. *J. Nutr.* 2001; 131, 59-65.
- Adcox C, Boyd L, Oehrl L, Allen J, Fenner G. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *J Agric Food Chem.* 2001; 49, 2090-5.
- Aguilera Y, Dorado ME, Prada FA, Martínez JJ, Quesada A y Ruiz-Gutiérrez V. The protective role of squalene in alcohol damage in the chick embryo retina. *Experimental Eye Research.* 2005; 80, 535-543.
- Akasbi M, Shoeman DW y Csallany AS. HPLC of selected phenolic compounds in olive oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1993; 70, 367-370.
- Alba-Mendoza J, Hidalgo F, Ruiz MA, Martínez F, Moyano MJ, Cert A, Pérez-Camino MC y Ruiz-Méndez MV. Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación. *Grasas y Aceites.* 1996; 47, 163-181.
- Alonso-Villaverde C, Segues T, Coll-Crespo B, Perez-Bernalte R, Rabassa A, Gomila M, et al. High-density lipoprotein concentrations relate to the clinical course of HIV viral load in patients undergoing antiretroviral therapy. *Aids.* 2003; 17, 1173-8.
- Amelio M, Rizzo R y Varazini F. Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high-performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques. *Journal of chromatography.* 1992; 606, 179-185.
- Andersson SW, Skinner J, Ellegard L, Welch AA, Bingham S, Mulligan A, Andersson H y Khaw KT. Intake of dietary plant sterols is inversely

related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 58, 1378-1385.

- AOAC. Extraction of lipids. Method 976.26-F. In: P Cunniff, ed. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburgh, MD: AOAC International. 1999.
- Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN y Papageorgiou VP. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. *J. Med. Food*. 2002; 5, 1-7.
- Aparicio R y Harwood J. *Manual del Aceite de Oliva*. AMV Ediciones, Madrid. 2003.
- Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER 3rd, Conlin PR, Erlinger TP, Rosner BA, Laranjo NM, Charleston J, McCarron P, Bishop LM; OmniHeart Collaborative Research Group. Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *JAMA*. 2005; 294, 2455-64.
- Artho A, Grob K y Mariani C. On-line LC-GC for the analysis of the minor components in edible oils and fats: the direct method involving silylation. *Fat Sci Technol*. 1993; 95, 176-180.
- Artacho del Pino A. Procedimiento para la desecación y tratamiento de orujos de aceituna. 1999. Patente 009900526.
- Aviram M, Eias K. Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab*. 1993; 37, 75-84.
- Auerbach AJ. Severity, duration, and mechanisms of insulin resistance during acute infections. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989; 69, 317-23.
- Aukrust P, Liabakk N-B, Müller F, Lien E, Espevik T, Frøland SS. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  and soluble TNF receptors in

human immunodeficiency virus type 1 infection - correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J. Infect Dis.* 1994; 169, 420-4.

- Austin MA, Brunzell JD, Fitch WL, Krauss RM. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis.* 1990; 10, 520-30.
- Awad AB y Fink CS. Phytosterol as anticancer dietary components; evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition.* 2000; 130, 2127-2130.
- Awad AB, Von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC. Beta-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Res.* 1998; 18, 471-3
- Azzi A, Gysin R, Kempna P, Ricciarelli R, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. The role of alpha-tocopherol in preventing disease: from epidemiology to molecular events. *Mol Aspects Med.* 2003; 24, 325-36.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis.* 1999; 20, 2209-18.
- Batta A K, Guorong Xu, Honda A, Miyazaki T, Salen G. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. *Metabolism clinical and experimental.* 2006; 55, 292-299.
- Baxter JH: Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with Refsum's disease. *J. Lipid Res.* 1968; 9, 636-641.
- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med.* 2000; 32, 164-76.
- Berry EM, Eisenberg S, Friedlander Y, Harats D, Kaufmann NA, Norman Y, Stein Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins-the Jerusalem Nutrition Study. II. Monounsaturated fatty acids vs carbohydrates. *Am J Clin Nutr.* 1992; 56, 394-403.

- Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest.* 1974; 53, 1033-43.
- Biggerstaff KD y Wooten JS. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Adv Physiol Educ.* 2004; 28, 105-6.
- Bishop JE, Hajra AK. Mechanism and specificity of formation of long chain alcohols by developing rat brain. *J. Biol Chem.* 1981; 256, 9542-9550.
- Bishop JE, Hajra AK. Specificity of reduction of fatty acids to long chain alcohols by rat brain microsomes. *J Neurochem.* 1978; 30, 643-647.
- Biedermann M, Grob K y Mariani C. *Fat Sci Technol.* 1993; 4,127-133.
- Boberg K, Petteresen KS, Prydz H. Toxicity of sitosterol to human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1991; 51, 509-516.
- Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, Dorella M, Maiorino M, Ursini F. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb.* 1992b; 12, 529-33.
- Boskou, D. In "Olive oil, Chemistry and Technology"; D. Boskou, Ed., AOLS Press: Champaign, 1998; 67-103.
- Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli, F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis.* 2006.
- Bravo E, Flora L, Cantafora A, De Luca V, Tripodi M, Avella M, Botham KM. The influence of dietary saturated and unsaturated fat on hepatic cholesterol metabolism and the biliary excretion of chylomicron cholesterol in the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1390, 134-48.
- Brody T. *Lipids. Nutritional Biochemistry.* 1<sup>st</sup> ed. San Diego, California: Academic Press. Inc. 1994; 249-291.

- Cabello-Moruno R, Perona JS, Ruiz-Gutierrez V. Influence of minor components of olive oils on the composition and size of TRLs and on macrophage receptors involved in foam cell formation. *Biochem Soc Trans.* 2007a; 35, 470-1.
- Cabello-Moruno R, Perona JS, Osada J, Garcia M, Ruiz-Gutierrez V. Modifications in postprandial triglyceride-rich lipoprotein composition and size after the intake of pomace olive oil. *J Am Coll Nutr.* 2007b; 26, 24-31.
- Castano G, Mas R, Gamez R, Fernandez J, Illnait J, Fernandez L, Mendoza S, Mesa M, Gutierrez JA, Lopez E. Concomitant use of policosanol and beta-blockers in older patients. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2004; 24, 65-77.
- Cert A, Moreda W, León M y Pérez-Camino MC. Determinación de absorción de luz ultravioleta a 232 nm, composición en ácidos grasos, trilinoleína y triglicéridos con número equivalente de carbonos igual a 42, en aceites de oliva y de orujo de oliva. *Grasas y aceites.* 1996b (a); 47, 6.
- Cert A, Moreda W Y García-Moreno J. Determinación de esteroides y dialcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y Aceites.* 1997; 48, 207-218.
- Cert A, Alba M, Pérez-Camino MC, Ruiz-Gómez A, Hidalgo F, Moreda W, Moyano MJ, Martínez F, Tubaileh R y Olías M. Influencia de los sistemas de extracción sobre las características y los componentes menores del aceite de oliva virgen extra. *Olivae.* 1999; 79, 41-50.
- Cert A, Moreda W y Pérez-Camino MC. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A.* 2002; 881, 131-148.

- Chen JT, Wesley R, Shamburek RD, Pucino F, Csako G. Meta-analysis of natural therapies for hyperlipidemia: plant sterols and stanols versus policosanol. *Pharmacotherapy*. 2005; 25, 171-83.
- Colomer R, Menendez JA. Mediterranean diet, olive oil and cancer. *Clin Transl Oncol*. 2006; 8, 15-21
- Daly GG, Finocchiaro ET, Richardson T. Characterization of some oxidation products of beta-sitosterol. *J Agric. Food Chem*. 1983; 31, 46-50.
- De Jong A, Jogchum P y Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J. Nutr. Biochem*. 2003; 14, 362-369.
- De la puerta R, Martinez-Dominguez E y Ruiz-Gutierrez V. Effect of minor components of virgin olive oil on topical anti-inflammatory assay. *Z naturforsch [C]*. 2000; 55, 814-819.
- Duthie GG, Bellizzi MC. Effects of antioxidants on vascular health. *Br Med Bull*. 1999; 55, 568-77.
- EEC. Commission Regulation (EEC) No. 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off J Eur Commun L*. 1991; 248, 1-48.
- Eglinton G, Hamilton RJ. Leaf epicuticular waxes. *Science*. 1967; 156, 1322-1335.
- Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL. Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1994; 93, 1493-501.
- Eliot A. Brinton, MD, M. Nazeem Nanjee, PHD, Paul N. Hopkins, MD, MSPH. Triglyceride-Rich Lipoprotein Remnant Levels and Metabolism. *JACC*. 2004; 43, 12.
- Engler MB, Engler MM. Docosahexaenoic acid--induced vasorelaxation in hypertensive rats: mechanisms of action. *Biol Res Nurs*. 2000; 2, 85-95.

- Engler MB, Ma YH, Engler MM. Calcium-mediated mechanisms of eicosapentaenoic acid-induced relaxation in hypertensive rat aorta. *Am J Hypertens*. 1999; 12, 1225-35.
- Escriba PV, Sánchez-Domínguez JM, Alemany R, Perona JS y Ruiz-Gutiérrez V. 2003. Alteration of lipids, G proteins, and PKC in cell membranes of elderly hypertensives. *Hypertension*. 41, 176-182.
- Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51, 1279-92.
- Esuoso KO, Lutz H, Bayer E y Kutubuddin M.. Unsaponifiable lipid constituents of some underutilized tropical seed oils. *J Agric Food Chem*. 2000; 48, 231-4.
- Ettinger WH. Lipid levels and risk of atherosclerotic coronary heart disease in the older person. *Med Clin North Am*. 1989; 73, 1525-30.
- Feingold KR, Staprans I, Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Doerrler W, Dinarello CA, Grunfeld C. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J Lipid Res*. 1992; 33, 1765-76.
- Feingold KR, Krauss RM, Pang M, Doerrler W, Jensen P, Grunfeld C. The Hypertriglyceridemia of Acquired Immunodeficiency Syndrome is associated with an increased prevalence of Low Density Lipoprotein subclass pattern B. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76, 1423-7.
- Fernández-Arche A, Marquez-Martín A, De la Puerta R, Perona JS, Terencio C, Perez-Camino MC, Ruiz-Gutierrez V. Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008.
- Fernández S, Más R, Gamez R, Diaz A, Fernández J, Deibis Orta S, Illnait J, Castaño G, Mendoza S, Valdés F, Alvarez E. A pharmacological



surveillance study of the tolerability of policosanol in the elderly population. *Am J Geriatr Pharmacother.* 2004; 2, 219-29

- Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, Guida L, Dello Russo A, Marotta T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med.* 2000; 160, 837-42.
- Ferreira GC, Patton JS. Inhibition of lipolysis by hydrocarbons and fatty alcohols. *J Lipid Res.* 1990; 31, 889-897.
- Folch J, Less M y Sloan-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipid from the animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 33, 497-509.
- Gallina-Toschi T, Bendini A y Lercker G. *Chromatographia.* 1996; 43, 195-199.
- Gamboa R, Lira A. Lipoproteínas y riesgo cardiovascular. *Diagnostico.* 1999; 38.
- Gamez R, Maz R, Arruzazabala ML, Mendoza S, Castano G. Effects of concurrent therapy with policosanol and omega-3 fatty acids on lipid profile and platelet aggregation in rabbits. *Drugs R D.* 2005; 6, 11-9.
- Gill CI, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G, McGlynn H, Rowland I. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int J Cancer.* 2005; 117, 1-7.
- Glew RH. Lipid metabolism II. Pathways of metabolism of special lipids. En: *Biochemistry.* Devlin TM (Ed), 1997; 397-409.
- Grandgirard A, Martine L, Demaison L, Cordelet C, Joffre C, Berdeaux O y Semon E. Oxyphytosteroles are present in plasma of healthy human subjects. *British Journal of Nutrition.* 2004; 91, 101-106.
- Griffin BA. Low density lipoprotein heterogeneity. *Bailliere's Clin Endocrinol and Metab.* 1995; 9, 687-704

- Grundy SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N Engl J Med.* 1986; 314, 745-8.
- Grunfeld C. Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1992; 327, 329-37
- Grunfeld, Pang M, Doerrle W, Shugenaba JK, Jensen P, Feingold KR. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992; 74, 1045-52.
- Grunfeld C, Adi S, Soued M et al. Search for mediators of the lipogenic effects of tumor necrosis factor: potential role for interleukin 6. *Cancer Res.* 1990; 50, 4233-8.
- Grunfeld C, Kotler DP, Shigenaga JK, Doerrler W, Tierney A, Wang J, et al. Circulating Interferon- $\alpha$  Levels Hypertriglyceridemia in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am J Med* 1991; 90, 154-62.
- Grunfeld C, Kotler DP, Hamadeh R, Tierney A, Wang J, Pierson RN, et al. Hypertriglyceridemia in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am J Med* 1989; 86, 27-31.
- Grob K, Artho A y Mariani C. *Fat Sci Technol.* Determination of raffination of edible oils and fats by olefinic degradation products of sterols and squalene, using coupled LC-GC 1992; 94, 394-400.
- Grinspoon SK, Bilezikian JP. HIV disease and the endocrine system. *N Engl J Med.* 1992; 327, 1360-5
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. *Lipid Biochemistry.* 5th Edition, Blackwells Scientific, Oxford. 2002; 320.
- Guillén N, Acín S, Navarro MA, Perona JS, Arbonés-Mainar JM, Arnal C, Sarría AJ, Surra JC, Carnicer R, Orman I, Segovia JC, Ruiz-Gutiérrez V, Osada J. Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis.* 2008;197, 72-83

- Gutfinger T, Letan A. Quantitative changes in some unsaponifiable components of soya bean oil due to refining. *J Sci Food Agric.* 1974; 25, 1143-7.
- Hamada T, Egashira N, Nishizono S, Tomoyori H, Nakagiri H, Imaizumi K, Ikeda I. Lymphatic absorption and deposition of various plant sterols in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, a strain having a mutation in ATP binding cassette transporter G5. *Lipids.* 2007; 42, 241-8.
- Hanahan DJ. Platelet activating factor: A biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55, 483-509.
- Hargrove JL, Greenspan P, Hartle DK. Nutritional significance and metabolism of very long fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004; 229, 215-26.
- Harwood JL, Yaqoob P. Nutritional and health aspects of olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2002; 104, 685-697.
- Hashim YZ, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G, Kaisalo L, Wähälä K, Gill CI. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Int J Cancer.* 2008; 122, 495-500.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. "Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia". *Hum. Mutat.* 1993; 1, 445-66.
- Holmes MD, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Hankinson SE, Speizer FE, Rosner B, Willett WC. Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *JAMA.* 1999; 281, 914-20.
- Honda A, Salen G, Nguyen LB, et al. Down-regulation of cholesterol biosynthesis in sitosterolemia: diminished activities of acetoacetyl-CoA thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, reductase, squalene synthase, and 7-dehydrocholesterol delta7-reductase in liver and mononucle. *J Lipid Res.* 1998; 39, 44-50.

- Hue L. Futile cycles and regulation of metabolism. In *Metabolic Compartmentation* (Sies H, ed.). London: Academic Press.1982; 71-97.
- Ichihara K, Kusunose E, Noda Y, Kusunose M. Some properties of the fatty alcohol oxidation system and reconstitution of microsomal oxidation activity in intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 878, 412-418.
- ISO. Method 12228. Animal and vegetable fats and oils. Determination of individual and total sterols content. Gas chromatographic method. ISO/FDIS 12228. International Standard Office. 1999.
- IUPAC. Determination of the unsaponifiable matter. Method 2401. In: Paquot, A Hautfenne, eds. *IUPAC Standard Method for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7<sup>th</sup> ed, Blackwell, Oxford. 1992.
- IUPAC. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities, *Pure & Appl. Chem.*1995; 67, 1699.
- Jaross W, Assmann G, Bergmann S, Schulte H. Comparison of risk factors for coronary heart disease in Dresden and Münster. Results of the DRECAN (Dresden Cardiovascular Risk and Nutrition) study and the PROCAM (Prospective Cardiovascular Münster) Study. *Eur J Epidemiol*. 1994; 10, 307-15.
- Jialal I, Devaraj S, Kaul N. The effect of alpha-tocopherol on monocyte proatherogenic activity. *J Nutr*; 2001; 131, 389S-94S.
- Jones PJH y Papamandjaris AA. Lipids: Cellular metabolism. En: Bowman BA, Russell RM, eds. *Present knowledge in Nutrition*. Washington DC: ILSI Press. 2001; 104-114.
- Janikula M y Candidate ND. Policosanol: A New treatment for cardiovascular disease? *Altern Med Rev*. 2002; 7, 203-217.
- Juan ME, Planas JM, Ruiz-Gutierrez V, Daniel H, Wenzel U. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br J Nutr*. 2008;100, 36-43.

- Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA y Hamsten A. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest.* 1993; 91, 748-758.
- Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med.* 1999; 246, 341-355.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol.* 1986; 124, 903-15.
- Khovidhunkit W, Memon RA, Shigenaga JK, Pang M, Schambelan M, Mulligan K, Feingold KR, Grunfeld C. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism.* 1999; 48, 1524-31.
- Khovidhunkit W, Kim MS, Menon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanism and consequences to the host. *J Lip Res* 2004; 45, 1169-96.
- Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, Kassner A, Fobker M, Abuja PM, Assmann G, Wahrburg U. Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56, 72-81
- Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D, Witztum JL; Nutrition Committee of the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation.* 2004; 110, 637-41.
- Kunst I, Samuels AL. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research.* 2002; 42, 51-80.
- Kushi L, Giovannucci E. Dietary fat and cancer. *Am J Med.* 2002; 113 Suppl 9B:63S-70S.

- Kottukudy E. Plant waxes. *Lipids*. 1970; 5, 259-275.
- Kubo I, Muroi H, Kubo A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. *Bioorg Med Chem*. 1995; 3, 873-880.
- Kunitake ST, Mendel CM, Hennessy LK. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J Lipid Res*. 1992; 33, 1807-16.
- Lahoz C, Alonso R, Ordoñas JM, Lopez-Farre A, de Oya M, Mata P. Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. *Eur J Clin Invest*. 1997; 27, 780-7.
- Lesellier, E. Analysis of non-saponifiable lipids by super-/subcritical-fluid chromatography. *J Chromatogr A*. 2001; 936, 201-214.
- Lanzón A, Albi T, Cert A y Gracian J. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *JAOCS*. 1994; 71, 285-291.
- Larsson K. Physical functions and technical applications. *Lipid-Molecular Organization*. The Oily Press Ltd. Dundee. 1994.
- Lee T-C. Characterization of fatty alcohol: NAD oxidoreductase from rat liver. *J Biol Chem*. 1979; 254, 2892-2896.
- Lee M, Lu K, Patel S B. Genetic basis of sitosterolemia. *Curr. Opin. Lipidol.* , 2001; 12, 141-149.
- Lehninger AL, Nelson DL y Cox MM. *Principles of biochemistry*. 2 edition. Worth Publishers Inc. New York (USA). 1993.
- León M y Cert A. Recomendaciones para la aplicación de algunos métodos analíticos incluidos en la Reglamentación CEE 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva. *Grasas y Aceites*. 1994; 45, 395-401.
- Lichtenstein AH, Jones PJH. Lipids: Absorption and Transport. En: Bowman, B.A., Russell, R.M. eds. *Present knowledge in Nutrition*. Washington DC: ILSI Press. 2001; 92-103.

- Lin DS, Connor WE, Phillipson BE. Sterol composition of normal human bile. Effects of feeding shellfish (marine) sterols. *Gastroenterology*. 1984; 86, 611-7.
- Ling WH y Jones PJ. Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol- free phytosterol mixtures in altering lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats. *Atherosclerosis*. 1995; 118, 319-331
- Linos A, Kaklamani VG, Kaklamani E, Koumantaki Y, Giziaki E, Papazoglou S, Mantzoros CS. Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables? *Am J Clin Nutr*. 1999; 70, 1077-82.
- Lyons MA, Brown AJ. 7-Ketocholesterol. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999; 31, 369-75.
- Lyons MA, Samman S, Gatto L, Brown AJ. Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol in vivo: implications for dietary oxysterols. *J Lipid Res*. 1999; 40, 1846-57.
- Marais AD, Blom DJ, Firth JC. "Statins in homozygous familial hypercholesterolemia". *Curr Atheroscler Rep* 2002; 4, 19-25.
- Mahadevan V. Fatty alcohols: chemistry and metabolism. *Prog Chem Fats Other Lipids*. 1978; 15, 255-299.
- Mattson FH y Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res*. 1985; 26, 194-202.
- Mariani C, Fedeli E y Morchio G. Structural Modifications of triterpene alcohols during olive oil refining. *Riv Ital Sost Grasse*. 1978; 64, 359.
- Malecka M. The effect of squalene on the heat stability of rapeseed oil and model lipids. *Die Nahrung*. 1991; 35, 541-542.
- Malins DC, Wekell JC. The lipid biochemistry of marine organisms. *Prog Chem Fats Other Lipids* 1969; 10, 337-363.

- Mamo J, Proctor S, Smith D. Retention of chylomicron remnants by arterial tissue: importance of an efficient clearance mechanism from plasma. *Atherosclerosis* 1998; 141, 563-9.
- Mañez S, Recio MC, Giner RM y Rios JL. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 334, 103-105.
- Martínez-Domínguez E, De la Puerta R y Ruiz-Gutiérrez V. Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflamm Res.* 2001; 50, 102-106.
- Martínez-González J, Rodríguez-Rodríguez R, González-Díez M, Rodríguez C, Herrera MD, Ruiz-Gutierrez V, Badimon L. Oleanolic acid induces prostacyclin release in human vascular smooth muscle cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *J Nutr.* 2008;138, 443-8.
- Mataix J y Sánchez de Medina F. Lípidos. En: *Alimentación y Nutrición humana*. Ed. Ergón. 2000.
- Mataix J. *Nutrición y alimentación humana*. Vol. I, Nutrientes y alimentos. Ergón. 2002.
- McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* 1971; 23; 285, 1441-6.
- Moreda W, Pérez-Camino MC y Cert A. Analysis of Neutral Lipids: Unsaponifiable Matter. *Handbook of Food Analysis, 2nd Edition. Physical Characterization and Nutrient analysis.* 2004.
- McCarty MF. Policosanol safely down-regulates HMG-CoA reductase - potential as a component of the Esselstyn regimen. *Med Hypotheses.* 2002; 59, 268-79.
- Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR. Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology* 1993; 132, 2246-53.



- Moghadasian MH; McManus BM; Pritchard PH; Frohlich JJ. "Tall Oil"-Derived Phytosterols Reduce Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997; 17, 119-126.
- Moghadasian MH; McManus BM; Godin DV; Rodrigues B, Frohlich JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation*. 1999; 99, 1733-1739.
- Moghadasian MH; Frohlich JJ. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med*. 1999. 107, 588-94.
- Moreau RA, Whitaker BD y Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*. 2002; 41, 457-500.
- Menendez R, Marrero D, Mas R, Fernandez I, Gonzalez L, Gonzalez RM. In vitro and in vivo study of octacosanol metabolism. *Arch Med Res*. 2005; 36, 113-9.
- Moreno JJ, Mitjavila MT. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *J Nutr Biochem*. 2003; 14, 182-95.
- Muti P, Awad AB, Schünemann H, Fink CS, Hovey K, Freudenheim JL, Wu YWB, Bellati C, Pala V y Berrino F. A plant food-based diet modifies the serum  $\beta$ -Sitosterol concentration in hyperandrogenic postmenopausal women. *Journal of Nutrition*. 2003; 133, 4252-4255.
- Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997; 6, 1101-3.
- Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 889, 193-203.
- Nicolaidis N. The monoene and other wax alcohols of human skin surface lipid and their relation to the fatty acids of this lipid. *Lipids*. 1967; 2, 266-275.

- Nielsen, J. H., Olsen, C. E., Duedahl, C., Skibsted, L. H. Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *J. Dairy Res.* 1995; 62, 101-113
- O'Brien JS, Sampson EL. Lipid composition of the normal human brain: Gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res.* 1965; 6, 537-544.
- Oku H, Shudo J, Mimura K, Haratake A, Nagata J, Chinen I. 1-O-Alkyl-2,3-diacylglycerols in the skin surface lipids of hairless mouse. *Lipids.* 1995; 30, 169-172.
- Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma.* 2004; 51, 407-414.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer.* 2000a; 36, 1235-47.
- Owen RW, Haubner R, Wurtele G, Hull E, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev.* 2004; 13, 319-26.
- Owen RW, Spiegelhalder B, Bartsch H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. *Gut.* 2000b; 46, 225-32.
- Paganuzzi V. On the composition of Iranian olive oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1979; 56, 925.
- Pandey M, Sharma LB, Singh S, Shukla VK. Erythrocyte membrane fatty acid profile and saturation index in gallbladder carcinogenesis: a case-control study. *World J Surg Oncol.* 2003; 1, 5.
- Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87, 3894-8.
- Patel SB, Honda A, Salen G. Sitosterolemia: exclusion of genes involved in reduced cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res.* May 1998; 39, 1055-61.

- Perona JS, Cañizares J, Montero E, Sánchez-Domínguez JM y Ruiz-Gutiérrez V. Plasma lipid modifications in elderly people after administration of two virgin olive oils of the same variety (*Olea europaea* var. hojiblanca) with different triacylglycerol composition. *Br. J. Nutr.* 2003; 89, 819-826.
- Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, Mühlberger V, Knapp E, Dunn JK, Gotto AM Jr, Patsch W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12, 1336-45.
- Perona JS, Canizares J, Montero E, Sanchez-Dominguez JM, Catala A, Ruiz-Gutierrez V. Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clin Nutr.* 2004a; 23, 1113-21.
- Perona JS, Martínez-González J, Sanchez-Domínguez JM, Badimon L, Ruiz-Gutierrez V. The unsaponifiable of virgin olive oil in chylomicrons from men improves the balance between vasoprotective and prothrombotic factors released by endothelial cells. *Human Nutrition and Metabolism.* 2004.
- Place AR. Comparative aspects of lipid digestion and absorption: physiological correlates of wax ester digestion. *Am J Physiol.* 1992; 263, 464-71.
- Pérez-Jiménez F, Espino A, Lopez-Segura F, Blanco J, Ruiz-Gutierrez V, Prada JL, Lopez-Miranda J, Jimenez-Perez J y Ordovas JM. Lipoprotein concentrations in normolipidemic males consuming oleic acid- rich diets from two different sources: olive oil and oleic acid-rich sunflower oil. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62, 769-775.
- Plat J, Brzezinka H, Lütjohann D, Mensink RP, von Bergmann K. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2001; 42, 2030-8.
- Plank C y Lorbeer E. *J Chromatogr A.* 1994; 683, 95-104.

- Plank C y Lorbeer E. *J High Resolut Chromatogr.* 1993; 16, 483-490.
- Pringle MJ, Brown KB, Miller KW. Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols? *Mol Pharmacol.* 1981; 19, 49-55.
- Proctor SD, Vine DF, Mamo JC. Arterial retention of apolipoprotein B (48) and B(100)-containing lipoproteins in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2002 Oct; 13, 461-70.
- Rallidis L, Naoumova RP, Thompson GR, Nihoyannopoulos P. "Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia". *Heart.* 1998; 80, 583-90.
- Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest.* 1993; 91, 668-76.
- Recio MC, Giner RM, Mañez S y Rios JL. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.* 1995; 61, 182-185.
- Riendeau D, Meighen E. Enzymatic reduction of fatty acids and acyl-CoAs to long chain aldehydes and alcohols. *Experientia.* 1985; 41, 707-713.
- Rimm EB, Stampfer MJ. Antioxidants for vascular disease. *Med Clin North Am.* 2000; 84, 239-49.
- Rivera R, Brajkovich I, Lilue M, Kaswan E, Comellas A, Pérez González M, Simpson T. Dislipidemias en infección por virus de inmunodeficiencia humana en diferentes estados de la enfermedad: estudio prospectivo en 41 pacientes / Hyperdipilemia in infection by human inmunodeficiency virus in differents stades of the disease: study in 41 patients. *Med. interna (Caracas).* 2001; 17, 39-43.
- Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA, Phillips MW. Fatty alcohol metabolism in cultured human fibroblasts. Evidence for a fatty alcohol cycle. *J Biol Chem.* 1987; 262, 17412-17419.

- Rodríguez-Rodríguez R, Herrera MD, Perona JS y Ruiz-Gutiérrez V. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in orujo olive oil, on rat aorta. *British Journal of Nutrition*. 2004; 92, 635-642.
- Rodríguez-Rodríguez R, Stankevicius E, Herrera MD, Ostergaard L, Andersen MR, Ruiz-Gutiérrez V, Simonsen U. Oleanolic acid induces relaxation and calcium-independent release of endothelium-derived nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 2008.
- Rodríguez-Vidigal FF, Muñoz-Sanz A. Alteraciones en el metabolismo de los lípidos en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Una hipótesis acerca de su patógena. *Med Clin (Barc)*. 2000; 115, 145-50.
- Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno J, Bellido, Perez-Martinez P, Lozano A, Gómez P, Jiménez Y, Pérez Jiménez F. Phenolic Content of Virgin Olive Oil Improves Ischemic Reactive Hyperemia in Hypercholesterolemic Patients. *Journal of the American college of cardiology*. 2005; 46, 1864-1868.
- Ruiz-Gutiérrez V, de la puerta R, Perona JS. Beneficial effects of virgen olive oil on health. En: *Recent research developments in nutrition*. Pandalai SG, Transworld Research Network; Trivandrum, India, 2000.
- Señorans FJ, Villen J, Tabera J y Herraiz M. *J Agric Food Chem*. 1998; 46, 1022-1026.
- Salas J, Lopez Miranda J, Jansen S, Zambrana JL, Castro P, Paniagua JA, Blanco A, Lopez Segura F, Jimenez Pereperez JA, Perez Jimenez F. The diet rich in monounsaturated fat modifies in a beneficial way carbohydrate metabolism and arterial pressure. *Med Clin (Barc)*. 1999; 113, 765-9.
- Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkila E, Taskinen MR. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism*. 1988; 37, 859-65.

- Sánchez-Moral P, Ruiz-Mendez MV. Obtención del aceite de orujo. *Grasas y Aceites*. 2006; 57, 47-55.
- Sánchez-Taínta A, Estruch R, Bulló M, Corella D, Gómez-Gracia E, Fiol M, Algorta J, Covas MI, Lapetra J, Zazpe I, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E, Martínez-González MA. Adherence to a Mediterranean-type diet and reduced prevalence of clustered cardiovascular risk factors in a cohort of 3204 high-risk patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008; 15, 589-593.
- Shefer S, Salen G, Bullock J, Nguyen LB, Ness GC, Vhao Z, Belamarich PF, Chowdhary I, Lerner S, Batta AK, Tint GS. The effect of increased hepatic sitosterol on the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol 7 alpha-hydroxylase in the rat and sitosterolemic homozygotes. *Hepatology*. 1994; 20, 213-219.
- Serrano P, Yago MD, Manas M, Calpena R, Mataix J, Martinez-Victoria E. Influence of type of dietary fat (olive and sunflower oil) upon gastric acid secretion and release of gastrin, somatostatin, and peptide Y in man. *Dig Dis Sci*. 1997; 42, 626-33.
- Sieri S, Krogh V, Pala V, Muti P, Micheli A, Evangelista A, Tagliabue G, Berrino F. Dietary Patterns and Risk of Breast Cancer in the ORDET Cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2004; 13, 567-572.
- Snipes W, Person S, Keller G, Taylor W, Keith A. Inactivation of lipid-containing viruses by long-chain alcohols. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977; 11, 98-104.
- Steinberg D. Refsum disease. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WAS, Valle D, Eds.). New York: McGraw-Hill. 1995; 2, 2351-2369.
- Stetten D, Schoenheimer R. The biological relations of the higher aliphatic alcohols to fatty acids. *J Biol Chem*. 1940; 133, 347-357.

- Tang AM, Jacobson DL, Spiegelman D, Knox TA, Wanke C. Increasing risk of 5% or greater unintentional weight loss in a cohort of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 1; 40, 70-6.
- Tang AM. Weight loss, wasting, and survival in HIV-positive patients: current strategies. *AIDS Read*. 2003;13, S23-7
- Tapiero H, Townsend DM y Tew KD. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003; 57, 321-325.
- Toledo E, Delgado-Rodríguez M, Estruch R, Salas-Salvadó J, Corella D, Gomez-Gracia E, Fiol M, Lamuela-Raventós RM, Schröder H, Arós F, Ros E, Ruíz-Gutiérrez V, Lapetra J, Conde-Herrera M, Sáez G, Vinyoles E, Martínez-González MA. Low-fat dairy products and blood pressure: follow-up of 2290 older persons at high cardiovascular risk participating in the PREDIMED study. *Br J Nutr*. 2008; 20, 1-9.
- Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D. Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9, 869-73.
- Valsta LM, Lemstrom A, Ovaskainen ML, Lampi AM, Toivo J, Korhonen T y Piironen V. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *British Journal of Nutrition*. 2004; 92, 671-678.
- Varady KA, Ebine N, Vanstone CA, Parsons WE y Jones PJH. Plant sterols and endurance training combine to favorably alter plasma lipid profiles in previously sedentary hypercholesterolemic adults after 8 wk. *American Journal Clinical Nutrition*. 2004; 80, 1159-1166.
- Vial J, Jardy A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. *Anal. Chem*, 1999; 71, 2672-2677.
- Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*. 2002.

- Villen J, Blanch GP, Ruiz-del-Castillo ML y Herraiz M. *J Agric Food Chem.* 1998; 46, 1419-1422.
- Wahle KW, Caruso D, Ochoa JJ, Quiles JL. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids.* 2004; 39, 1223-31.
- Wang YW, Jones PJ, Pischel I, Fairrow C. Effects of policosanols and phytosterols on lipid levels and cholesterol biosynthesis in hamster. *Lipids.* 2003; 38, 165-70.
- Waterman E y Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev.* 2007; 12, 331-42.
- Wilcox CM, Rabeneck L, Friedman S. Malnutrition and cachexia, chronic diarrhea, and hepatobiliary disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Gastroenterology* 1996; 111, 1724-1752.
- Williams CM, Francis-Knapper JA, Webb D, Brookes CA, Zampelas A, Tredger JA, Wright J, Meijer G, Calder PC, Yaqoob P, Roche H, Gibney MJ. Cholesterol reduction using manufactured foods high in monounsaturated fatty acids: a randomized crossover study. *Br J Nutr.* 1999; 81, 439-46.
- Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, Williams CM, Newsholme EA, Calder PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67, 129-35.
- Yaqoob P. Monounsaturated fats and immune function. *Proc Nutr Soc.* 1998; 57, 511-20.
- Zangerle R, Sarcletti M, Gallati H, Reibnegger G, Wachter H, Fuchs D. Decreased plasma concentrations of HDL cholesterol in HIV-infected individuals are associated with immune activation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994; 7, 1149-56.
- Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Markiewski M, Ciechanowicz A, Kaczmarczyk M, Naruszewicz M. Selective inhibition by alpha-tocopherol



of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 274, 609-15.

- Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation.* 1979; 60, 473-85.
- Zoeller RA, Morsand OH, Raetz CRH. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem.* 1988; 263, 11590-11596.

AG	Ácido graso
ACAT	AcylcoenzimaA colesterol acyltransferasa
AGS	Ácidos grasos saturados
AGI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
AOAC	Association of Analytical Communities
ATP	Adenosin trifosfato
Apo	Apolipoproteína o apoproteína
CCF	Cromatografía de capa fina
CETP	Proteína de transferencia de colesterol éster
C-HDL	Colesterol unido a HDL
C-LDL	Colesterol unido a LDL
CCK	Colecistoquinina
Cu	Cobre
CD4	Linfocitos CD4
EC	Esteres de colesterol
ECV	Enfermedad cardiovascular
FID	Detector de ionización de llama
FL	Fosfolípidos
FRA	Fase de respuesta aguda
GC	Cromatografía de Gases
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas.
HAART	Terapia antirretroviral.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HF	hipercolesterolemia familiar heterocigota
HV	Hospital Virgen del Rocío
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
INF	Interferón

ITRN	Inhibidores de la transcriptasa reversa de tipo nucleósido
IP	Inhibidores de la proteasa
IS	Internal Standard
LDD	Límite de detección
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPL	Lipoproteína lipasa
LRP	Proteína relacionada con el receptor LDL
MUFA	Ácido graso monoinsaturado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	óxido nítrico
ND	No Detectado
OR	Aceite de orujo de oliva refinado
OL	Aceite de oliva refinado
OMS	Organización mundial de salud
PAF	Factor de activación plaquetaria
PAF-AH	Factor de activación plaquetaria acetilhidrolasa
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
PPM	Partes por millón
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
QM	Quilomicrón
QMR	Quilomicrón remanente
R <sub>f</sub>	Front referance
R <sub>t</sub>	Tiempo de retención
r.p.m	Revolución por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Si-SPE	extracción en fase sólida con cartuchos de sílice
SB	Sales biliares
S <sub>f</sub>	Svedvergs flotación
TG	Triglicéridos

TMS	Trimetilsilil
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRL	Lipoproteína rica en triglicérido
U.m.a	Unidad masa atómica
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
Zn	Zinc