



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Formación de oxiesteroles en el huevo en polvo durante el proceso de atomización y el almacenamiento

Francesc Guardiola Ibarz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

87
P.N.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS HUMANAS Y
DE LA NUTRICIÓN - UNIVERSIDAD DE BARCELONA.

Programa de Doctorado (bienio 89-91): "Nutrición, Tecnología
e Higiene de los Alimentos."

**FORMACIÓN DE OXIESTEROLES EN EL
HUEVO EN POLVO DURANTE EL PROCESO DE
ATOMIZACION Y EL ALMACENAMIENTO.**

Memoria presentada por Francesc Guardiola Ibarz para optar
al Grado de Doctor en Farmacia.



DIRECTORES:
Dr. Josep Boatella Riera
Dr. Rafael Codony Salcedo

TUTOR:
Dra. Magdalena Rafecas Martínez

Barcelona, junio 1994.



7

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.	7
A. Oxidación del colesterol.	9
B. Formación de los oxisteroles en alimentos: factores que intervienen.	29
C. Efectos biológicos de los oxisteroles.	47
D. Metodología analítica para la determinación de oxisteroles.	87
III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.	143
IV. PARTE EXPERIMENTAL.	149
A. composición en ácidos grasos y contenido en colesterol del huevo fresco.	151
1. Extracción de la grasa en huevo y ovoproductos.	153
2. Composición en ácidos grasos del huevo fresco: determinación, variabilidad y valor nutricional.	161
3. Determinación selectiva del contenido de colesterol en el huevo por cromatografía de gases.	211
B. Puesta a punto de un método analítico para la determinación de oxisteroles en huevo en polvo.	229
C. Contenidos de oxisteroles en huevo fresco y ovoproductos.	329
D. Formación de oxisteroles en huevo en polvo producido por atomización.	339
1. Introducción.	341
2. Formación de oxisteroles durante la producción de huevo en polvo: efecto de la temperatura de atomización.	347
3. Formación de oxisteroles durante la producción y almacenamiento de huevo en polvo: efecto de la temperatura; tipo y concentración de antioxidante; y tiempo y condiciones de almacenamiento.	401
V. CONCLUSIONES.	479
VI. APÉNDICES.	489
Apéndice 1-Lista de símbolos y abreviaturas.	491

I. INTRODUCCIÓN.

La evolución producida en los últimos años, en relación con el conocimiento de la composición, modificación e interacciones entre los componentes de los alimentos, ha permitido la consecución de nuevas perspectivas sobre los efectos de los mismos en el individuo.

Este mayor conocimiento se ha producido, sin duda, gracias a la posibilidad de utilizar técnicas analíticas con gran poder de resolución y sensibilidad, de tal manera que la presencia de compuestos minoritarios en los alimentos puede ser constatada y su evolución seguida a lo largo de la cadena alimentaria. Es precisamente sobre algunos de estos compuestos sobre los que se focaliza, en la actualidad, la búsqueda de relaciones entre alimentación y salud.

Por otra parte, esta evolución ha permitido también la mejor utilización de los alimentos o de algunos de sus componentes desde un punto de vista tecnológico o bien en el desarrollo de nuevos métodos y sistemas de control.

Uno de los campos que por múltiples razones (consumo, aspectos nutricionales, relación con determinadas patologías, etc.) ofrece un mayor interés, es el de los lípidos. Esta fracción, que aparenta una cierta simplicidad, es en realidad extremadamente compleja y ello queda patente en el constante debate a que se ve sometido el estudio de sus efectos sobre el individuo. En este sentido, debe destacarse el hecho de que recientemente se viene concediendo una gran atención a los procesos de oxidación que padecen los compuestos lipídicos. Este proceso, ya sea de tipo metabólico o como simple alteración de los sustratos, conduce a la formación de compuestos de estructuras y familias químicas muy diversas, algunos de los cuales presentan demostrada actividad biológica.

De entre los compuestos lipídicos uno de los más estudiados y controvertidos es el colesterol. Identificada ya en el año 1740 en los cálculos biliares, esta molécula posee, como ya es sabido, una especial importancia que motiva un permanente interés por parte de investigadores de diferentes ámbitos. El Dr. Alsina Bofill en unos coloquios mantenidos en 1964 en la *Societat catalana de Biologia* señalaba: "Hace muchos años que el colesterol circula por los laboratorios, por las academias, por las revistas científicas e incluso por la prensa no profesional y sensacionalista, pero, a pesar de ello, sigue encerrando tal cantidad

de incógnitas que conserva, tanto para el fisiólogo como para el bioquímico o el terapeuta, un viva actualidad". Esta frase mantiene su vigencia en nuestros días, pues, sobre este compuesto se conocen bien su biosíntesis, sus mecanismos de regulación, sus funciones en el organismo, etc., pero queda por establecer de forma concluyente su implicación en el proceso aterosclerótico y en las enfermedades cardiovasculares. Nuevas incógnitas se han planteado al asociar el colesterol con diversos procesos oxidativos. Estos procesos pueden ser de tipo enzimático o no, conduciendo los de tipo enzimático a la formación de intermediarios metabólicos en la biosíntesis de ácidos biliares y hormonas esteroideas. Los procesos no enzimático se conocen ya desde 1904, cuando Schulze y Winterstein constataron que el colesterol en su forma cristalina sufría un proceso de transformación química, como consecuencia de su exposición a radiaciones solares. Posteriormente, Bergström y Wintersteiner (1941, 1942a, 1942b) comprobaron la naturaleza oxidativa del fenómeno. Pero hicieron falta varios años para llegar a la conclusión de que este proceso se produce por un mecanismo radicalario que da lugar a la formación de hidroperóxidos (Smith, 1990; Teng *et al.*, 1973; Teng y Smith, 1973), compuestos químicamente lábiles que se descomponen de forma secundaria en una amplia gama de productos de oxidación, que poseen una o varias funciones de tipo alcohol, cetona, peróxido y/o epóxido, y que genéricamente se denominan oxisteroles. Dentro de los procesos no enzimáticos el más importante es la autooxidación. Inicialmente, se pensó que en el organismo humano sólo tenía lugar la oxidación enzimática del colesterol, pero, últimamente, se ha postulado que en él también acontecen los procesos no enzimáticos (Smith 1990, 1991).

El interés del estudio de los oxisteroles radica, actualmente, en establecer el papel de los mismos en la regulación de la síntesis de colesterol y a lo largo del proceso aterosclerótico. En relación con los efectos biológicos de los oxisteroles, ya a finales de los años 60, Bischoff (1969) demostró que el colesterol-5 α ,6 α -epóxido, administrado subcutáneamente en ratas y ratones, inducía la formación de tumores. Un poco más tarde, Kandutsch y Chen (1973) constataron la capacidad de ciertos oxisteroles para inhibir la síntesis del colesterol.

Fueron Acker y Greve quienes en 1963 pusieron de manifiesto su presencia en alimentos. Sin embargo, fue a partir de la década de los 80, cuando aparecieron distintos trabajos que permitieron conocer las principales especies presentes en alimentos, sus contenidos y sus

mecanismos de formación. Estos derivados se formarían, sobretodo en los alimentos con una elevada densidad en colesterol (ovoproductos, productos lácteos, productos cárnicos, etc.), como consecuencia de su exposición a radiaciones y de la aplicación sobre ellos de procesos térmicos o bien durante su almacenamiento.

Aparece, por tanto, una diversidad de posibles componentes hasta ahora desconocidos en este tipo de alimentos, cuyos efectos sobre el organismo no están bien establecidos, pero que ofrecen un campo de investigación realmente atractivo y que, una vez más, nos sugiere la enorme complejidad del concepto de alimento.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

II. A. OXIDACIÓN DEL COLESTEROL.

1. Introducción.	11
2. Oxidación enzimática.	11
3. Oxidación no enzimática.	13
4. Actividad antioxidante <i>in vivo</i> del colesterol.	17
5. Bibliografía.	20

1. INTRODUCCIÓN.

Sobre la molécula de colesterol (colest-5-en-3 β -ol) (figura 1) pueden producirse fenómenos oxidativos, ya sea por vía enzimática o no. Ambos procesos conducen a la formación de un gran número de derivados, entre los cuales, los denominados oxisteroles (OE) se caracterizan por poseer una o varias funciones de tipo alcohol, cetona, peróxido y/o epóxido (tabla 1).

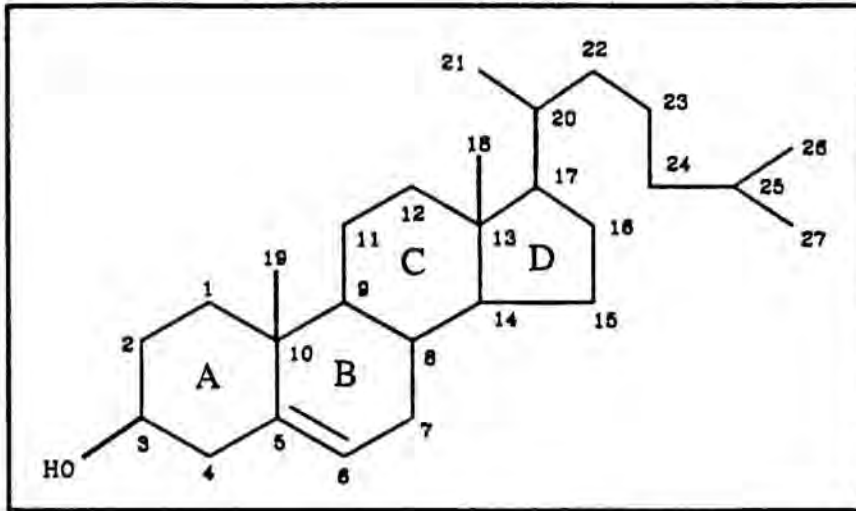
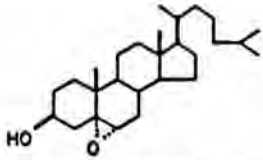
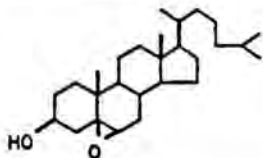
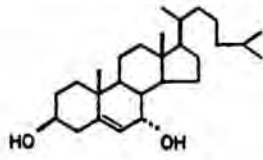
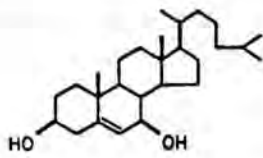
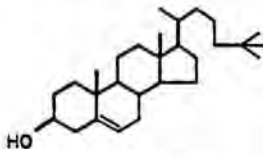
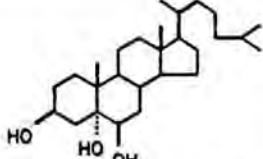
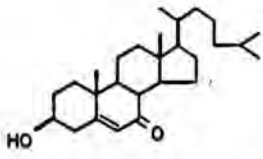


Figura 1-Molécula del colesterol (colest-5-en-3 β -ol).

2. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA.

La oxidación enzimática de esta molécula tiene lugar, catalizada por complejos enzimáticos, básicamente a nivel hepático y de los tejidos generadores de hormonas esteroideas. A nivel hepático, se forman una serie de compuestos implicados en la biosíntesis de ácidos biliares (7 α -HC, 25-HC, (25R)-26-HC y (25S)-26-HC, ver abreviaturas en apéndice 1); mientras que a nivel de tejidos esteroideogénicos se forman compuestos que son intermediarios metabólicos en la biosíntesis de hormonas esteroideas (22R-HC, (20R,22R)-colest-5-en-3 β ,20,22-triol) (Craetes de Paulet *et al.*, 1988; Florez *et al.*, 1987; Harper *et al.*, 1980; Herrera, 1986; Rawn, 1989; Smith, 1990, 1991). Por otro lado, en el cerebro se forma el cerebrosterol (24S-HC) compuesto sobre el cual no se conoce su importancia fisiológica. Referente al tema, también cabe destacar el estudio de Watabe *et al.* (1980) en el que se demostró que

Tabla 1-Nomenclatura y fórmula estructural de los principales OE detectados en productos alimenticios.

Nombres sistemáticos	Nombres vulgares	Fórmula estructural
<p>5,6α-epoxi-5α-colestan-3β-ol</p> <p style="text-align: center;">α-CE^a</p>	<p>Colesterol-5α,6α-epóxido α-epóxido de colesterol 5α,6α-epoxicolestanol Colesterol α-óxido α-epoxicolesterol 5α,6α-epóxido α-epóxido</p>	
<p>5,6β-epoxi-5β-colestan-3β-ol</p> <p style="text-align: center;">β-CE^a</p>	<p>Colesterol-5β,6β-epóxido β-epóxido de colesterol 5β,6β-epoxicolestanol Colesterol β-óxido β-epoxicolesterol 5β,6β-epóxido β-epóxido</p>	
<p>Colest-5-en-3β,7α-diol</p> <p style="text-align: center;">7α-HC^a</p>	<p>7α-hidroxicolesterol</p>	
<p>Colest-5-en-3β,7β-diol</p> <p style="text-align: center;">7β-HC^a</p>	<p>7β-hidroxicolesterol</p>	
<p>Colest-5-en-3β,25-diol</p> <p style="text-align: center;">25-HC^a</p>	<p>25-hidroxicolesterol</p>	
<p>5α-colestan-3β,5,6β-triol</p> <p style="text-align: center;">CT^a</p>	<p>Colestan-triol Colestantriol</p>	
<p>3β-hidroxicolest-5-en-7-ona</p> <p style="text-align: center;">7-CC^a</p>	<p>7-cetocolesterol</p>	

a Símbolo

en los microsomas hepáticos bovinos, en presencia de NADPH, Fe SO₄ y ADP, el colesterol era transformado en α -CE, β -CE y CT, siendo la relación entre estos compuestos 1.0:4.3:0.7. En este estudio se observó que el citocromo P-450, que está profundamente implicado en la formación de OE en el cuerpo humano, no lo estaba en la formación de los epóxidos del colesterol. Asimismo, se constató que los CEs eran transformados en CT gracias a la acción de la epoxicolesterol hidrolasa. Esta constatación se realizó utilizando un inhibidor de esta enzima (5,6 α -imino-5 α -colestano-3 β -ol). La formación, *in vitro*, del CT ya había sido observada, en 1962, por Danielsson y Horning en eritrocitos humanos.

Por otro lado, actualmente, se está ensayando la fermentación bacteriana como método para la reducción de colesterol en ovoproductos. En relación con este punto, Przybylski *et al.* (1993) estudiaron la transformación que sufría el colesterol al ser fermentado con *Bacillus coagulans* B1, una de las cepas utilizadas para eliminar el colesterol del huevo. En este estudio, se observó que el colesterol, durante la fermentación, fue oxidado hasta un 35%, identificándose los siguientes OE: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 20-HC. Según esto, la utilización de determinadas cepas bacterianas para eliminar los azúcares del huevo podría dar lugar también a la formación de estos compuestos, aunque no se tiene constancia de trabajos concluyentes al respecto.

3.OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA.

Por otra parte, la oxidación no enzimática del colesterol se conoce desde principios de siglo, cuando Schulze y Winterstein (1904) constataron que esta sustancia en su forma cristalina sufría un proceso de transformación, como consecuencia de su exposición a radiaciones solares. Posteriormente, Bergström y Wintersteiner (1941, 1942a, 1942b) comprobaron la naturaleza oxidativa del fenómeno, pero hicieron falta aún varios años para conocer los mecanismos de este proceso. Los estudios de oxidación no enzimática del colesterol se realizan en modelos experimentales donde el colesterol se encuentra en su forma cristalina, en solución o dispersión acuosa. Los modelos que trabajan en solución o dispersión son más válidos desde el punto de vista de que el colesterol en alimentos y seres vivos se encuentra

en un entorno acuoso. Uno de los trabajos más importantes con modelos experimentales fue el de Smith *et al.* (1967), en este trabajo se aplicó la CCF para determinar los productos de oxidación del colesterol bajo diferentes condiciones, entre las cuales figuran:

- oxidación del colesterol en dispersiones coloidales a diferentes temperaturas y con diferentes iones de metales de transición como catalizadores;
- oxidación del colesterol en presencia de aire a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo.
- oxidación del colesterol calentado a 65 °C en presencia de aire durante diferentes períodos de tiempo;
- oxidación del colesterol al ser irradiado, dispuesto en forma de fina película, con luz UV (254 nm);

El más ampliamente estudiado de los mecanismos no enzimáticos de oxidación es el de la **autooxidación** causado por el oxígeno molecular triplete ($^3\text{O}_2$), una de las muchas especies diatómicas del oxígeno capaces de oxidar la molécula de colesterol. La autooxidación del colesterol se inicia con la formación de un radical centrado en el carbono alílico número 7, generado por radiación o bien por otros radicales. Este radical reacciona con $^3\text{O}_2$ formándose un radical peroxil que se estabiliza por fijación de hidrógeno dando lugar a los 7-hidroperóxidos del colesterol (α y β). Estos dos epímeros se encuentran en equilibrio, pero el equilibrio está desplazado hacia la forma termodinámicamente más estable, que es la β . Por otro lado, estos dos hidroperóxidos son térmicamente inestables y se descomponen de forma secundaria dando lugar a 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC (Teng *et al.*, 1973). Los dos epímeros del 7-HC se encuentran en equilibrio, también desplazado hacia la forma β . El 7-CC en caliente y en medio básico se descompone dando lugar a la 3,5-colestadien-7-ona (figura 2).

En principio el radical peroxil que se forma con mayor facilidad es el que se sitúa en el carbono número 7. No obstante, por reacciones de transferencia de radicales se pueden formar otros radicales peroxil y sus correspondientes hidroperóxidos. De esta manera, se forman los radicales peroxil sobre la cadena lateral que dan lugar a una serie de derivados hidroxilados del colesterol (20-HC, 24-HC, 25-HC, 26-HC y 27-HC). De estos derivados

destacan los que se forman sobre los carbonos terciarios (25-HC y 20-HC). En la figura 2 sólo se esquematiza la formación del 25-HC pero los otros derivados hidroxilados sobre la cadena lateral se forman de manera analoga.

La autoxidación también podría iniciarse con la formación de un radical centrado en el carbono número 4, que es el otro carbono alílico del colesterol. No obstante, esto no sucede así posiblemente por el impedimento estérico que provoca el grupo hidroxilo del carbono 3 y el hecho de que el carbono 5 sea terciario (Maerker, 1987). Los hidroperóxidos del colesterol, así como el H_2O_2 , oxidan el colesterol dando lugar a α -CE y β -CE (Smith *et al.*, 1978). Estos epímeros están en equilibrio pero predomina la forma β . A partir de estos dos compuestos por hidrólisis se forma el CT. En medio ácido, la forma β se hidroliza más rápidamente que la α (Maerker, 1987; Maerker y Bunick, 1986).

Esta autoxidación se puede producir de forma análoga sobre los esteroides vegetales (Yanishlieva-Maslarova y Marinova, 1985).

Otro de los mecanismos de oxidación no enzimática del colesterol es la **peroxidación lipídica**. Este proceso conlleva la formación de los mismos OE que se forman durante la autoxidación sobre el anillo B del colesterol (7α -HC, 7β -HC, 7-CC, α -CE, β -CE y CT). La peroxidación lipídica se diferencia de la autoxidación en que sus inicios están vinculados a procesos enzimáticos que implican la formación de hidroperóxidos o peróxidos cíclicos de los lípidos capaces de iniciar la oxidación del colesterol o incluso de los esteroides vegetales.

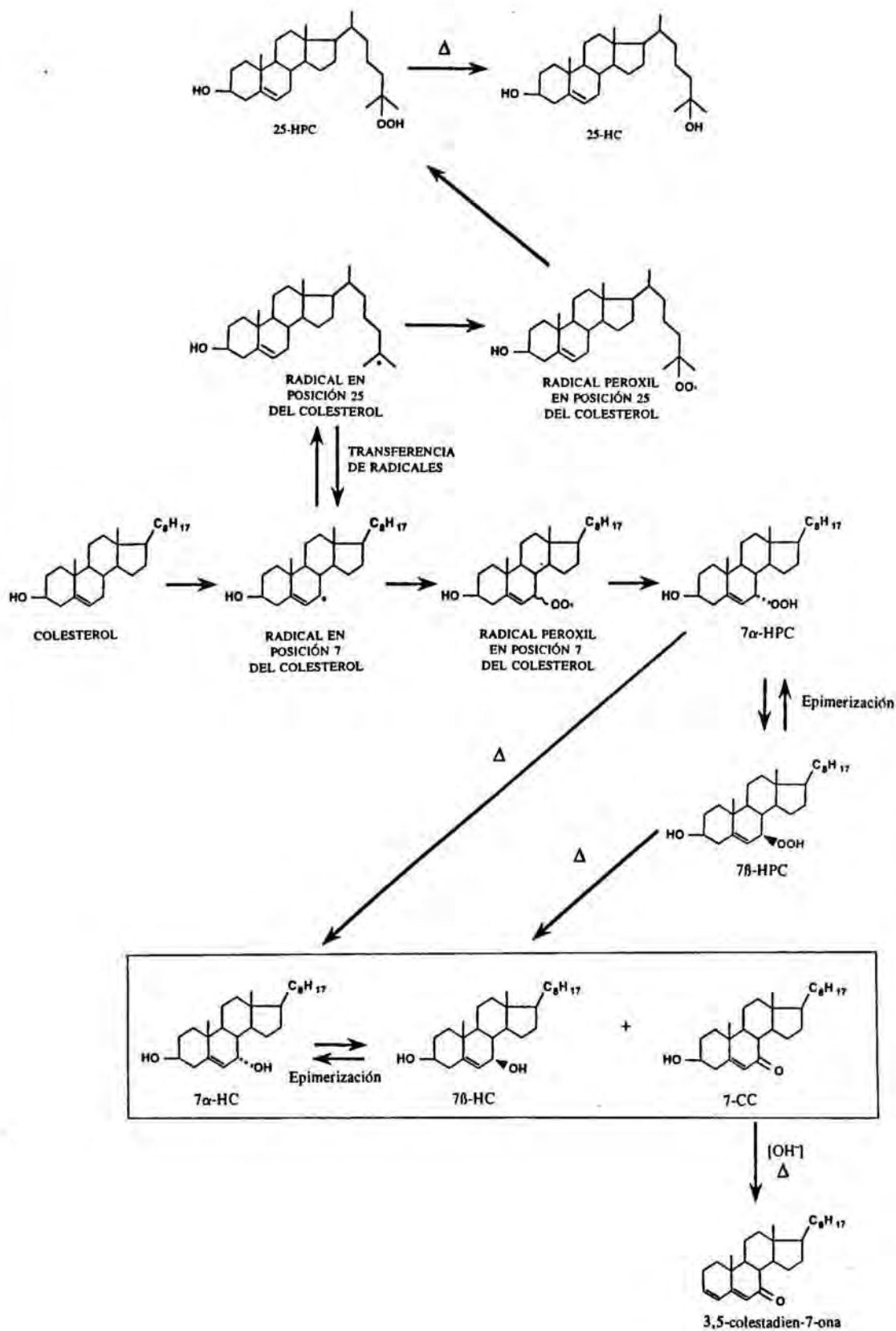


Figura 2-Autoxidación del colesterol. Formación de los derivados oxidados sobre el anillo B y la cadena lateral (Smith, 1990).

La oxidación fotoquímica es otro de los mecanismos no enzimáticos de oxidación del colesterol. La exposición a la luz y aire del colesterol no conlleva otra cosa que el proceso de autooxidación ya descrito anteriormente. No obstante, por otro lado, el colesterol es oxidado por el oxígeno molecular singulete (1O_2), especie generada fotoquímicamente a partir de oxígeno molecular triplete (3O_2) (Bhagavan y Nair, 1992). De esta manera se forman hidroperóxidos, siendo el formado en mayor cantidad el 3 β -hidroxi-5 α -colest-6-en-5-hidroperóxido (figura 3). Por descomposición térmica de este hidroperóxido se forman colest-4,6-dien-3-ona y 5 α -colest-6-en-3 β ,5-diol. El 5 α -hidroperóxido por transposición estereoespecífica da lugar al 3 β -hidroxi-7 α -colest-5-en-7-hidroperóxido que se descompone dando lugar a 7 α -HC y 7-CC. En este proceso también se forma en una menor proporción el 3 β -hidroxicolest-4-en-6-hidroperóxido y sus productos de descomposición térmica (colest-4-en-3 β ,6-dioles y 3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona).

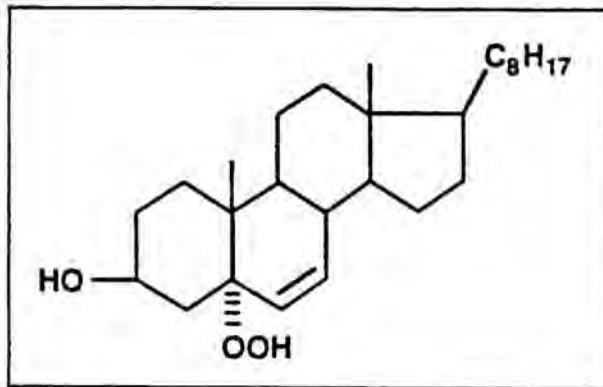


Figura 3-3 β -hidroxi-5 α -colest-6-en-5-hidroperóxido (5-hidroperóxido).

Además de estos tres mecanismos, el colesterol puede ser oxidado no enzimáticamente por una serie de oxidantes como son las especies triatómicas (O_3) y otras diatómicas (O_2^+) del oxígeno, los óxidos de nitrógeno (NO y NO_2), el CCl_4 , etc. También se puede citar que las radiaciones gamma provocan la oxidación del colesterol en su anillo A.

4.ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DEL COLESTEROL.

Inicialmente, se pensó que en el organismo humano sólo tenían lugar los procesos de oxidación enzimática, pero, últimamente, se ha postulado que en él también acontece la

oxidación no enzimática (Smith, 1990, 1991). Además, según estos autores el colesterol actuaría, *in vivo*, como un poderoso antioxidante plasmático que reaccionaría con los oxidantes endógenos dando lugar a los OE. Estos oxidantes endógenos se formarían durante el metabolismo de las especies diatómicas del oxígeno. Los OE formados por esta vía son eliminados con relativa facilidad de la sangre por vía hepática y excreción fecal. Por otro lado, también está a favor de la hipótesis la comprobada actividad antioxidante del colesterol *in vitro*, ya sea interceptando oxidantes biológicos (Gumulka *et al.*, 1982; Smith, 1990; Smith y Jaworski, 1988; Smith *et al.*, 1978; Smith y Stroud, 1978; Smith y Teng, 1974; Teng y Smith, 1973, 1976) o protegiendo de la oxidación a liposomas (Gutteridge, 1978; Sevanian y McLeod, 1987; Szebeni y Toth, 1986) o a eritrocitos (Clemens *et al.*, 1987; Jain y Shohet, 1981). En relación con este tema, Blackwelder y Pike (1990) comprobaron, al separar los TG y los FL de la fracción grasa del huevo, que estos compuestos se oxidaban con mayor facilidad que la fracción grasa en sí, lo cual parece demostrar la acción antioxidante del colesterol en este sustrato.

Por otro lado, esta hipótesis está relacionada con el hecho, comprobado epidemiológicamente, de que la mortalidad por enfermedades cardiovasculares está correlacionada de forma inversa con el "índice de actividad antioxidante acumulativa", que se define como:

[Vitamina E] [Vitamina C] [β -Caroteno] [Selenio]

[Colesterol]

Todas las concentraciones de este índice son plasmáticas (Duthie, 1991). Posiblemente, este hecho es debido a que una dieta pobre en antioxidantes naturales (los que figuran en el numerador del índice citado anteriormente) llevaría a que el colesterol tuviera que actuar como antioxidante dando lugar a sus correspondientes derivados oxidados, los cuales suponen un demostrado factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. También en relación con el tema, Gey *et al.* (1987, 1991) mediante un estudio epidemiológico observaron que los niveles plasmáticos de vitamina E eran un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y determinados tipos de cáncer. Además, en un estudio

realizado por Kok *et al.* (1991) se observó que una dieta rica en AGPI, pero pobre en antioxidantes naturales, era un factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis. Esto está relacionado con el hecho de que la ingestión de las altas cantidades de AGPI, no suficientemente protegidas por antioxidantes biológicos, recientemente, se ha intentado correlacionar con la oxidación de las LDL y, consecuentemente, con el papel de estas lipoproteínas oxidadas en el desarrollo del proceso aterosclerótico (Duthie, 1991). Trabajos recientes (apartado II.C.3., páginas 51-60) centran este efecto en la presencia de colesterol oxidado en estas lipoproteínas. En este punto, cabe hacer una reflexión sobre el papel protector antioxidante de la vitamina E, definido ya desde hace bastantes años y centrado en la protección de los AGPI. La carencia de esta vitamina está relacionada con ciertas alteraciones, básicamente: oxidación de lípidos tisulares y de las LDL y modificaciones en la coagulación sanguínea y en la estabilidad y permeabilidad de la membrana celular (Chiswick *et al.*, 1991; Esterbauer *et al.*, 1991; Gey *et al.*, 1991; Luc y Fruchart, 1991; Oski y Barnes, 1967). Desde los años 40, en diferentes trabajos se ha venido observando que, para evitar las alteraciones asociadas a la carencia de vitamina E, la ingestión de cantidades crecientes de AGPI debe ir acompañada de un aporte proporcional de esta vitamina. Más tarde, a principios de los años 60, se empezaron a establecer recomendaciones para la relación vitamina E/AGPI de la dieta (Branchi y Vaia, 1961). Además, recientemente, se ha comprobado que dietas ricas en vitamina E pueden prevenir la aparición de ciertas patologías relacionadas con la acumulación de radicales libres, como son las cataratas y ciertos tipos de cáncer (Comstack *et al.*, 1991; Knekt *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1991). Con el paso de los años, además de la vitamina E, se han ido estableciendo otros compuestos con actividad antioxidante en el organismo humano, como son, la vitamina C, los carotenoides, el selenio y, más recientemente el colesterol y los polifenoles (Frankel *et al.*, 1993; Renaud y De Logeril, 1992). De esta forma, parece ser que los antioxidantes biológicos, finalmente, también estarían ligados a la aparición del proceso aterosclerótico, vía la formación de OE, entre otros productos de oxidación.

Esta nueva hipótesis según la cual los OE presentes en sangre serían productos de oxidación del colesterol *in vivo*, se contradice con el hecho últimamente demostrado de que la ingestión de alimentos ricos en OE implica un aumento de los niveles plasmáticos de estos compuestos (Emanuel *et al.* 1991). Así, el origen de los OE presentes en sangre no está del todo claro;

aunque, sin embargo, los dos orígenes son perfectamente compatibles e incluso se puede postular un tercero, que consistiría en una formación de estos compuestos por mecanismos enzimáticos todavía no descubiertos. Por otro lado, se ha comprobado que los OE se absorben a nivel intestinal en animales de experimentación (Bascoul *et al.* 1986; Fornas *et al.*, 1984), y asimismo se ha observado que en el plasma humano los quilomicrones (Addis *et al.*, 1989) y las lipoproteínas (Addis *et al.* 1989, Peng *et al.* 1982) se encuentran asociados a OE. Así pues, relacionando estos estudios con el de Emanuel *et al.* (1991) se puede pensar que en el ser humano los OE muy posiblemente se absorberían a nivel intestinal, se incorporarían a quilomicrones y entrarían en la circulación sistémica unidos a lipoproteínas.

5. BIBLIOGRAFÍA.

Addis, P.B., Emanuel, H.A., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1989). Capillary GC quantification of cholesterol oxidation products in plasma lipoproteins of fasted humans. *Free Radical Biol. Med.* **7**, 179-182.

Bascoul, J., Domergue, N., Mourot, J., Debry, G. y Crastes de Paulet, A. (1986). Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 α -epoxy-5 α -cholesta-3 β -ol by the male Wistar rat. *Lipids* **21**, 744-747.

Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1941). Autoxydation of sterols in colloidal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol. *J. Biol. Chem.* **141**, 597-610.

Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1942a). Autoxydation of sterols in colloidal aqueous solution III. Quantitative studies on cholesterol. *J. Biol. Chem.* **145**, 309-322.

Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1942b). Autoxydation of sterols in colloidal aqueous solution IV. Influence of esterification and of constitutional factors. *J. Biol. Chem.* **145**, 327-333.

Bhagavan, H.N. y Nair, P.P. (1992). Antioxidants in dietary fats. En *Fatty acids in foods and their health implications* (C.K. Chow, Ed.). p.329-336. Marcel Dekker Inc., Nueva York-Basilea-Hong Kong.

Blackwelder, J.A. y Pike O.A. (1990). Oxidative stability of cholesterol-free egg lipid fractions. *J. Food Sci.* **55**, 92-94, 113.

Branchi, G. y Vaia, A. (1961). *Riv. Ital. Sost. Grasse* **38**, 477.

- Clemens, M.R., Ruess, M., Bursa, Z. y Waller, H.D. (1987). The relationship between lipid composition of red blood cells and their susceptibility to lipid peroxidation. *Free Radic. Res. Commun.* **3**, 265-271.
- Comstock, G.W., Helzlsouer, K.J. y Bush, T.L. (1991). Prediagnostic serum levels of carotenoids and vitamin E as related to subsequent cancer in Washington County, Maryland. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (suppl.), 260-264S.
- Crastes de Paulet, A., Astruc, M.E. y Bascoul, J. (1988). Les oxystérols: Propriétés biologiques et problèmes nutritionnels. En *Biologie des lipides chez l'homme*. p. 154-174. Editions Médicales Internationales, Paris, Francia.
- Chiswick, M., Gladman, G., Sinha, S., Toner, N. y Davies, J. (1991). Vitamin E supplementation and periventricular hemorrhage in the newborn. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (suppl.), 370-372S.
- Danielson, H. y Horning, M.G. (1962). On the oxidation of cholesterol by blood in vitro. *Acta Chem. Scand.* **16**, 774-775.
- Duthie, G.G. (1991). Antioxidant hypothesis of cardiovascular disease. *Trends in Food Sci. Tech.* Agosto 1991, 205-207.
- Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1991). Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.* **56**, 843-847.
- Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G. y Waeg, G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (suppl.), 314-321.
- Florez, J., Armijo, A.J. y Mediavilla, A. (1987). *Farmacología humana*. Vol. 2, p. 676-679. EUNUSA, Pamplona, España.
- Fornas, E., Martinez-Sales, V., Camañas, A. y Baguena, J. (1984). Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in the rat. *Arch. Farmacol. Toxicol.* **10**, 175-182.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. y Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* **341**, 1103.
- Gey, K.F., Brubacher, G.B. y Stahelin, H.B. (1987). Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 1368-1377.
- Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P. y Moser, U.K. (1991). Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (suppl.), 326-334S.

- Gumulka, J., Pyrek, J.S. y Smith, L.L. (1982). Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols. *Lipids* **17**, 197-203.
- Gutteridge, J.M.C. (1978). The membrane effects of vitamin E, cholesterol and their acetates on peroxidative susceptibility. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **22**, 563-572.
- Harper, H.A., Rodwell, V.W. y Mayes, P.A. (1980). *Manual de química fisiológica*. p. 918-926. Manual moderno, México D.F., México.
- Herrera, E. (1986). *Bioquímica*. p. 954-962. Interamericana. Madrid, España.
- Jain, S.K. y Shohet, S.B. (1981). Apparent role of cholesterol as an erythrocyte membrane antioxidant. *Clin. Res.* **29**, 336a.
- Knekt, P., Aromaa, A., Maatela, J., Aaran, R-K., Nikkari, T., Hakama, M., Hakulinen, T., Peto, R. y Teppo, L. (1991). Vitamin E and cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (suppl.), 283-286S.
- Kok, F.J., Van Poppel, G., Melse, J., Verheul, E., Schouten, E.G., Kruyssen, D.H.C.M. y Hofman, A. (1991). Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary atherosclerosis?. *Atherosclerosis* **31**, 85-90.
- Luc., G. y Fruchart, J-C. (1991). Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (suppl.), 206-209S.
- Maerker, G. (1987). Cholesterol autoxidation-current status. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 388-392.
- Maerker, G. y Bunick, F.J. (1986). Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 771-777.
- Oski, F.A. i Barnes, L.A. (1967). Vitamin E deficiency: a previously unrecognized cause of hemolytic anemia in the premature infant. *J. Pediat.* **70**, 211-220.
- Peng, S.K., Taylor, C.B., Mosbach, E.H., Huang, W.Y., Hill, J. y Mikkelsen, B. (1982). Distribution of 25-hydroxycholesterol in plasma lipoprotein and its role in atherogenesis. A study in squirrel monkeys. *Atherosclerosis*. **41**, 395-402.
- Przybilski, R., Eskin, N.A.M. y Cullimore, D.R. (1993). Transformation of egg cholesterol during bacterial transformation. *Food Chem.* **48**, 195-199.
- Rawn, J.D. (1989). *Bioquímica*. Vol 2, p. 564-567. Interamericana-Mc Graw Hill, Madrid, España.
- Renaud, S. y De Logeril, M. (1992). Vin, alcool, plaquettes et coronaropathies: le paradoxe français. *The Lancet (édition française)* **225**, 22-25.

- Robertson, J.McD., Donner, A.P. y Trevithick, J.R. (1991). A possible role for vitamins C and E in cataract prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (suppl.), 346-351S.
- Schulze, E. y Winterstein, E. (1904). Uber das verhalten des Cholesterins gegen des Lict. En Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of oxidation products in dairy products. B.D. Sander, D.E. Smith, P.B. Addis y S.W. Park. 1989. *J. Food Sci.* **54**, 874-879.
- Sevanian, A. y McLeod, L.L. (1987). Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers. *Lipids* **22**, 627-636.
- Smith, L.L. (1990). Mechanisms of formation of oxysterols: A general survey. En *Free radicals, lipoproteins, and membrane lipids* (A. Crastes de Paulet *et al.*, Ed.). p. 115-132. Plenum press, Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.
- Smith, L.L. (1991). Another cholesterol hypothesis: Cholesterol as antioxidant. *Free Radical Biol. Med.* **11**, 47-61.
- Smith, L.L. y Jaworski, K. (1988). Cholesterol epoxidations by defined oxygen species. En *Oxygen radicals in biology and medicine* (M.G. Simic, K.A., Taylor, Ward, J.F. y C. Von Sonntag, ed.). Plenum publishing corp., Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.
- Smith, L.L., Kulig, J.M., Miiller, D. y Ansari, G.A.S. (1978). Oxidation of cholesterol by dioxygen species. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 6206-6211.
- Smith, L.L., Matthews, W.S., Price, J.C., Bachmann, R.C. y Reynolds, B. (1967). Thin-layer chromatographic examination of cholesterol autoxidation. *J. Chromatogr.* **27**, 187-205.
- Smith, L.L. y Stroud, J.P. (1978). Sterol metabolism XLII. On the interception of singlet molecular oxygen by sterols. *Photochem. Photobiol.* **28**, 479-485.
- Smith, L.L. y Teng, J.I. (1974). Sterol metabolism XXIX. On the mechanism of microsomal lipid peroxidation in rat liver. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 2640-2641.
- Szebeni, J. y Toth, K. (1986). Lipid peroxidation in hemoglobin-containing liposomes. Effects of membrane phospholipids composition and cholesterol content. *Biochim. Biophys. Acta* **857**, 139-145.
- Teng, J.I., Kulig, M.J., Smith, L.L., Kan, G. y Van Lier J.E. (1973). Sterol metabolism. XX. Cholesterol 7 β -hydroperoxide. *J. Org. Chem.* **38**, 119-123.
- Teng, J.I., y Smith, L.L. (1973). Sterol metabolism XXIV. On the unlikely participation of singlet molecular oxygen in several enzyme oxygenations. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 4060-4061.
- Teng, J.I. y Smith, L.L. (1976). Sterol metabolism. XXXVII. On the oxidation of cholesterol by dioxygenases. *Bioorg. Chem.* **5**, 99-119.

Watabe, T., Kanai, M., Isobe, M. y Ozawa, N. (1980). Cholesterol α - and β -epoxides as obligatory intermediates in the hepatic microsomal metabolism of cholesterol to cholestanetriol. *Biochim. Biophys. Acta* **619**, 414-419.

Yanishlieva-Maslarova, N.V. y Marinova, E.M. (1985). Autoxidation of sitosterol in lipid systems of different unsaturation degree. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 622a.

**II.B. FORMACIÓN DE OXIESTEROLES EN ALIMENTOS:
FACTORES QUE INTERVIENEN.**

1. Introducción.	27
2. Acción de las radiaciones.	31
3. Tiempo y condiciones de almacenamiento.	32
4. Prevención de la autooxidación: adición de sal y antioxidantes.	34
5. Tratamientos tecnológicos.	34
6. Procesos de fritura y cocción.	37
7. Bibliografía.	38

1.INTRODUCCIÓN.

El estudio de los factores que influyen en la formación de OE, así como la determinación de su contenido en alimentos, poseen especial importancia debido a los efectos biológicos de estos compuestos y a que, tal como demostraron Emanuel *et al.* (1991) los OE de los alimentos son absorbidos por el organismo humano. Por esta razón, el conocimiento de los mecanismos de formación de los OE en los alimentos y de sus contenidos se convierte en un aspecto de gran interés, tanto para su utilización como parámetro de control, como para poder evaluar la ingesta real de OE en base a datos de consumo de alimentos.

Los factores que influyen en la formación de oxiesteroles en productos alimenticios son múltiples, pero según Sander *et al.* (1989), los más importantes, además de la presencia de oxígeno y del valor a_w , son: temperatura, radiaciones, agentes fotosensibilizantes, iones de metales de transición, tiempo de almacenamiento, pH y concentración de colesterol que presenta el alimento.

Por otro lado, también se han realizado estudios de formación de OE en alimentos referentes a la influencia de la adición de sal (Sander *et al.*, 1989), presencia de prooxidantes (Morgan y Armstrong, 1987, 1992) y de sustancias antioxidantes (Morgan y Armstrong, 1987; Park y Addis, 1986b; Pearson *et al.*, 1983, Rankin y Pike, 1993), así como respecto a sistemas de secado, utilizados en la obtención de algunos preparados alimenticios (Missler *et al.*, 1985; Morgan y Armstrong, 1987, 1992; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987, 1988b; Tsai y Hudson, 1985).

Por último, cabe citar algunos trabajos que estudian la formación de OE en sebos (Bascoul *et al.*, 1985; Park y Addis, 1986b; Pearson *et al.*, 1983; Ryan, 1982; Ryan *et al.*, 1981, Zhang y Addis, 1990) y mantequillas (Csiky, 1982; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988a; Pie *et al.*, 1990; Sander *et al.*, 1989), cuando estos productos son calentados a altas temperaturas durante períodos de tiempo variables. El interés de estos trabajos radica en el hecho de que permiten evaluar la autooxidación del colesterol, en condiciones similares a las que son sometidos estos productos cuando se utilizan como medios de fritura.

La presencia de OE ha sido puesta de manifiesto en distintos productos alimenticios, entre los cuales destacan algunos derivados lácteos, ovoproductos, productos cárnicos, alimentos sometidos a fritura y derivados de la pesca (tabla 1).

Las especies de OE más frecuentemente detectadas en productos alimenticios son las siguientes: α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT y 7-CC. Como norma general, de estos siete OE el que se presenta en concentraciones más elevadas es el 7-CC y el que lo hace a niveles más bajos es el 25-HC. Si bien, en cualquier caso, es importante destacar que la heterogeneidad en la metodología analítica y en el planteamiento de los estudios conducen a una cierta variabilidad de los resultados, que se observa en los diferentes estudios publicados. La tabla 2 presenta los niveles máximos y mínimos de OE detectados en diferentes productos alimenticios, procesados en condiciones, normalmente, utilizadas a nivel industrial (la bibliografía es la de la tabla 1). También se ha observado que en las pautas de formación de OE se pueden distinguir tres grupos diferenciados (Pie *et al.*, 1991; Zhang y Addis, 1990):

- C-7 OE;
- OE con función oxigenada en la cadena lateral;
- Colesterol epóxidos y CT.

También deben tomarse en consideración los derivados oxidados de los distintos fitosteroles, los cuales han sido mucho menos estudiados. A este respecto, Yanishlieva-Maslarova y Marinova (1985) mencionan productos de oxidación del sitosterol, tales como: $5,6\alpha$ -epoxi- 5α -estigmastan- 3β -ol (α -SE), $5,6\beta$ -epoxi- 5β -estigmastan- 3β -ol (β -SE), estigmast-5-en- $3\beta,7\alpha$ -diol (7α -HS), estigmast-5-en- $3\beta,7\beta$ -diol (7β -HS), 5α -estigmastan- $3\beta,5,6\beta$ -triol, 3β -hidroxi-estigmast-5-en-7-ona, estigmastan-3,5-dien-7-ona, etc, formados en diversos modelos experimentales. Por otro lado, en patatas fritas, Lee *et al.* (1985) detectaron derivados oxidados del sitosterol (7α -HS, 7β -HS y β -SE).

Tabla 1-Productos alimenticios en los que ha sido detectada la presencia de oxisteroles.

Productos lácteos	Ovoproductos	Productos cárnicos	Medios de fritura	Productos sometidos a fritura	Revisiones bibliográficas interesantes sobre el tema.
Cleveland y Harris, 1987. Csiky, 1982.	Fontana <i>et al.</i> , 1992. Henan y Lee, 1985.	Callany <i>et al.</i> 1989. De Vore, 1988.	Bascou <i>et al.</i> , 1986b. Csiky, 1982.	Lee <i>et al.</i> , 1985. Park y Addis, 1985.	Addis y Park, 1992. Finocchiaro y Richardson, 1983.
Finocchiaro <i>et al.</i> , 1984.	Missler <i>et al.</i> , 1985.	Higley <i>et al.</i> , 1986.	Nourouz-Zadeh y Appelqvist, 1988a.	Ryan, 1982.	
Jacobson, 1987.	Morgan y Armstrong, 1987, 1989, 1992.	Hwang y Maerker, 1993a, b.	Park y Addis, 1986a, b.	Zhang <i>et al.</i> , 1991.	
Luby <i>et al.</i> , 1986.	Naber y Bigger, 1985.	Nourouz-Zadeh y Appelqvist, 1989.	Pie <i>et al.</i> , 1990.	Derivados de la pesca	
Nourouz-Zadeh y Appelqvist, 1988a, b.	Nourouz-Zadeh y Appelqvist, 1987.	Park y Addis, 1985	Ryan <i>et al.</i> , 1981.	Oshima <i>et al.</i> , 1993.	
Pie <i>et al.</i> , 1990.	Pie <i>et al.</i> , 1990.	Pie <i>et al.</i> 1991.	Yan y White, 1990.		
Prasad y Subramanian, 1992.	Tsai y Hudson, 1984, 1985.	Zubillaga y Maerker, 1991.	Zhang y Addis, 1990.		
Sander <i>et al.</i> , 1988, 1989.	Tsai <i>et al.</i> , 1980.				
	Van de Bovenkamp <i>et al.</i> 1988.				

Tabla 2-Niveles máximos y mínimos de OE detectados en diferentes productos alimenticios, procesados en condiciones normalmente utilizadas a nivel industrial (la bibliografía es la de la tabla 1).

Productos Alimenticios	OXIESTEROLES (ppm)						
	α -CE ^a	β -CE	7 α -HC	7 β -HC	25-HC	CT	7-CC
Leche en polvo entera	ND ^b -0.6	ND-0.3	ND-1.4	ND-0.6	— ^c	--	ND-0.4
Leche en polvo desnatada	ND-2.6	ND-0.9	ND-2.0	ND-2.3	ND	ND	ND-2.5
Leche en polvo desnatada almacenada de 12-22 meses	0.9-1.8	0.7-4.0	4.5-12.5	6.6-20.8	0.3-0.5	ND	5.0-11.9
Mantequilla	ND-1.0	ND-1.2	ND-0.3	ND-4.0	ND-2.6	ND	ND-0.6
Queso parmesano	2.0-10.0	2.0-6.0	ND-32.0		2.0-5.0	ND-2.0	3.0-5.0
Queso cheddar	1.0-6.0	ND-2.0	ND	1.0-10.0	ND	ND	1.0-2.0
Huevo fresco	0.7	--	0.3		ND	ND	0.2
Huevo completo en polvo obtenido por atomización	ND-35.8	ND-44	ND-64.9		ND-2.3	ND-0.5	ND-11.2
Huevo completo en polvo liofilizado	ND	ND	ND-50.0		ND-25	ND	TR ^d -25
Yema de huevo en polvo obtenida por atomización	1.8-46	6.9-110.0	2.6-23.4	1.7-28.5	0.3-7.3	0.1-5.0	6.5-30.5
Carne de buey	0.1-0.4	0.4-1.1	ND-0.3	ND-0.3	0.1	ND	ND-1.1
Carne de ternera	0.03-0.17	0.09-0.47	0.18	0.21	0.05	ND	0.20-0.71
Carne de cerdo	0.02-0.22	0.04-0.35	0.19	0.28	0.13	0.04	0.07-1.13
Manteca de cerdo	ND-0.3	--	ND-TR	--	ND-0.2	--	TR-0.3
Sebos calentados a diferentes condiciones de temperatura durante diferentes períodos	10.0-42.8	--	14.0-21.2	13.9-28.2	--	--	9.1-71
Mantequilla calentada a diferentes condiciones de temperatura durante diferentes períodos	ND-2.9	ND-7.3	ND-52.2	ND-19.7	ND-25.0	ND-TR	ND-11.2
Medio de fritura calentado a 170 °C durante 40-112 hr (sebo/aceite de semilla de algodón, 90:10)	1.0-14.0	5.0-12.0	3.0-7.0	1.0-42.0	1.0-5.0	1.0-4.0	14.0-53.0
Patatas fritas	ND-3.0	ND-2.0	ND	6.8-58.8	3.0-16.0	2.0-7.0	4.1-18.0
Pescado salado y desecado	TR-13.1	TR-33.3	--	2.9-37.1	TR-10.7	TR-5.3	2.3-48.8
Pescado cocido y desecado	TR-18.0	TR-43.3	--	3.7-55.8	0.6-8.5	TR-39.1	4.0-60.6
Pescado ahumado	2.4	3.3	--	7.3	4.8	2.7	6.3

* Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), β -CE (5,6 β -epoxi-5 β -colestán-3 β -ol), 7 α -HC (colest-5-en-3 β , 7 α -diol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β , 7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β , 5,6 β -tríol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β , 25-diol).

^b No detectado.

^c No determinado.

^d Trazas.

2. ACCIÓN DE LAS RADIACIONES.

Como ya se ha dicho, a principios de siglo, Schulze y Winterstein (1904) observaron que el colesterol, en su forma cristalina, sufría una descomposición cuando era fuertemente irradiado con luz solar en presencia de aire, hecho que también fue advertido más tarde, en 1941, por Bergström y Wintersteiner. Posteriormente, se comprobó que la irradiación del colesterol en este mismo estado, a temperatura ambiente y con luz ultravioleta, conducía a la formación de los siguientes compuestos: 7α -HC, 7β -HC, 7-CC, colest-1,4-dien-3-ona y 5α -colestano (Fioriti y Sims, 1967). Sobre este punto Chicoye *et al.*, en 1968 (b), sugirieron que la intensidad de la oxidación fotoquímica experimentaba una disminución con el aumento de la longitud de onda, en las regiones ultravioleta, visible e infrarroja del espectro electromagnético.

Fue a finales de los años 60 cuando se empezaron a estudiar los efectos de las radiaciones sobre el colesterol contenido en alimentos. Concretamente, uno de los primeros estudios de los que se tiene referencia es el realizado por Chicoye *et al.* (1968a). Este equipo de investigadores realizaron un tratamiento sobre yema de huevo en polvo con radiaciones no ionizantes, consiguiendo de esta forma identificar, tras la exposición durante 12 días a la luz fluorescente o 5 horas a luz solar intensa, los siguientes productos mayoritarios de fotooxidación del colesterol: α -CE, 7α -HC, 7β -HC, CT y 7-CC (Herian y Lee, 1985).

Trabajos más recientes han estudiado el efecto de la irradiación con luz fluorescente sobre diversos alimentos, observándose que este tipo de luz inducía la formación de diversos OE. En relación con este punto, la formación de 7α -HC y 7β -HC se observó en el huevo en polvo (Herian y Lee, 1985) y en la mantequilla (Luby *et al.*, 1986). En cambio, cuando se irradiaron quesos en polvo se observó la formación de α -CE, β -CE, 7β -HC y 7-CC (Sander *et al.*, 1989).

También de forma reciente, Csallany *et al.* (1989) observaron que la exposición de carne picada de cerdo a la luz UV inducía la formación de OE (25-HC, 7-CC, 7β -HC y 7α -HC).

Las radiaciones gamma han sido utilizadas en algunos países para la conservación de carnes por su poder bactericida. Estas radiaciones poseen un notable poder oxidante y, debido a ello, son objeto de diferentes estudios en donde se evalúa su capacidad para generar derivados oxidados del colesterol en carnes. Maerker y Jones (1992) estudiaron como afectaba la irradiación con rayos gamma sobre las suspensiones acuosas de colesterol y de OE. En este estudio se observó que a partir del colesterol se formaron los siguientes compuestos: α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 7-CC, 6-cetocolesterol (6-CCL) y 7-cetocolesterol (7-CCL). En el mismo estudio también se observó que bajo la influencia de las radiaciones gamma el β -CE y, en menor grado, el α -CE pasaron a 6-CCL. Por otro lado, el 7α -HC, el 7β -HC y el 7-CC pasaron parcialmente a 7-CCL. Estas observaciones hacen pensar en el 6-CCL y el 7-CCL como marcadores para saber si las carnes han sido irradiadas. Más tarde Hwang y Maerker (1993a) estudiaron como influía la irradiación con rayos gamma de carnes de cerdo, buey y ternera. Estos autores observaron que las radiaciones gamma implicaban un aumento del nivel de OE en estas carnes, este aumento era mucho mayor con la posterior conservación de estas carnes durante dos semanas. Posteriormente, estos mismos autores (1993b) estudiaron la formación de 6-CCL en carnes de buey, cordero, ternera y pollo, sometidas y no a radiaciones gamma. En el caso de la carne de pollo no irradiada este compuesto no fue detectado, pero si lo fue, y a niveles apreciables, en la carne de pollo irradiada. Según esta observación este derivado es un buen marcador para saber si la carne de pollo ha sido o no irradiada. En las otras carnes el compuesto se detectó tanto si la carne había sido irradiada como si no, aunque en mayor proporción en la carne irradiada.

3. TIEMPO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.

El período de almacenamiento y las condiciones en que éste se realiza influyen de forma clara en la formación de OE en alimentos. Entre los factores que inciden en la misma, se citan los siguientes: temperatura (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987); radiaciones (Finochiaro *et al.*, 1984; Hwang y Maerker, 1993a; Sander *et al.*, 1989); humedad del producto (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987); presencia de sustancias prooxidantes y antioxidantes (Morgan y Armstrong, 1987); condiciones de almacenamiento con las ventajas que presenta el envasado en atmósfera inerte (Missler *et al.*, 1985; Finochiaro *et al.*, 1984)

o al vacío (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987); e incluso el tamaño del envase (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987).

Se ha comprobado que la conservación a 4 °C de carnes durante períodos de tiempo cortos conlleva un aumento significativo del nivel de OE (De Vore, 1988; Hwang y Merker, 1993a, Park y Addis, 1987; Zubillaga y Maerker, 1991). Por otro lado, se ha observado que la conservación de carnes a -20 °C durante 3 meses implica un ligero aumento en los niveles de OE (Pie *et al.*, 1991). No obstante, en un estudio de almacenamiento realizado sobre la manteca de cerdo refrigerada se comprobó que los niveles de OE no variaban significativamente entre los 2 y 18 meses (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1989).

Por otro lado, la conservación de los productos lácteos también ha sido ampliamente estudiada. Sander *et al.* (1988) estudiaron la formación de OE durante el almacenamiento de mantequilla a diferentes temperaturas de conservación (-26 °C, 4 °C y 16 °C), observando que los OE aumentaban sustancialmente durante la primera semana de almacenamiento y, posteriormente, permanecían relativamente constantes. Al mismo tiempo, se observó que la temperatura de conservación no presentaba un efecto significativo sobre la formación de OE. También Sander en compañía de otros autores (1989) observaron que el almacenamiento durante 6 meses de quesos en polvo a 4, 21 y 38 °C no implicó un aumento en el contenido de OE. No obstante, el almacenamiento de estos mismos productos a 4 °C durante 18 meses sí implicó un ligero aumento en el contenido de OE. Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1988b) determinaron el contenido de OE en leches en polvo desnatadas conservadas durante diferentes períodos de tiempo, observando un cierto aumento de los OE con el tiempo de conservación. Estos mismos autores observaron que el almacenamiento de mantequilla a 4 °C por períodos superiores a los 4 meses implicaba un aumento en el contenido de OE. Referente a la mantequilla, Pie *et al.* (1990) comprobaron la formación de OE durante el almacenamiento de este producto a -20 °C a lo largo de seis meses. Finocchiaro *et al.* (1984), en un estudio de conservación de aceites de mantequilla clarificados, observaron que el hecho de envasarlos en atmósfera inerte prevenía la formación de OE.

Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1987) realizaron un estudio de almacenamiento de ovoproductos en polvo, donde se observó que durante los dos primeros meses de

conservación a 4 °C no se formaban cantidades apreciables de OE, cosa que si sucedía cuando se alargaba el período de conservación. En este mismo estudio se comprobó que la formación de OE en yema de huevo en polvo puede ser parcialmente evitada mediante bajas temperaturas de conservación.

4.PREVENCIÓN DE LA AUTOOXIDACIÓN: ADICIÓN DE SAL Y ANTIOXIDANTES

Como es sabido, la oxidación lipídica en los alimentos es un proceso dependiente, entre otros, del factor actividad del agua (a_w) (Karel, 1980). La importancia del mismo, en relación con la formación de OE, ha sido estudiada por algunos autores.

En este sentido, Sander *et al.* (1989) estudian, sobre un producto derivado de la mantequilla, el efecto de la adición de diferentes concentraciones de sal, comprobando que esta adición juega un importante papel en la prevención de la autooxidación del colesterol. Para estos autores, una disminución en a_w implica una menor movilidad de los metales de transición, hecho que provoca un declive en la reactividad y en el efecto prooxidante de los mismos.

Se ha observado que la presencia de antioxidantes (glutacion, galato de propilo, BHA y BHT) o bien de mezclas sinérgicas de ellos (palmitato de ascorbilo más dl- α -tocoferol), previenen la formación de OE (Morgan y Armstrong, 1987; Park y Addis, 1986b; Pearson *et al.*, 1983).

5.TRATAMIENTOS TECNOLÓGICOS.

Algunos tratamientos tecnológicos pueden dar lugar a la formación de OE en mayor o menor grado. Destacan en este sentido, aquellos en los que se aplica un tratamiento térmico.

Se ha comprobado que el sistema de secado empleado en la obtención de productos deshidratados puede incidir en la formación de OE. En este sentido, el sistema más ventajoso para prevenir la formación de estos compuestos es la liofilización, pues, se ha observado que en ovoproductos recién elaborados, desecados por este sistema, no se detectan

OE (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987; Tsai y Hudson, 1984), al contrario de lo que se produce al obtener estos productos por atomización.

En estudios realizados sobre la influencia del sistema de atomización en la formación de OE, se ha comprobado que, si el aire que ejerce el efecto secante se calienta mediante una fuente de calor indirecta, la formación de OE es nula o poco significativa (Missler *et al.*, 1985; Morgan y Armstrong, 1987; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988; Tsai y Hudson, 1985), mientras que si este aire es calentado directamente a la llama de un mechero, la formación de OE es muy elevada (Missler *et al.*, 1985; Tsai y Hudson, 1985). Esto es debido, según diversos investigadores, a la presencia de óxidos de nitrógeno (NO y NO₂) producidos en la combustión del gas empleado en el mechero (Missler *et al.*, 1985; Tsai y Hudson, 1985; Morgan y Armstrong, 1989). Respecto a este punto, Morgan y Arsmtrong, en 1987, realizaron una importante comprobación, al añadir N₂O en el aire de un atomizador con fuente de calor indirecta. Este N₂O a las altas temperaturas que se registran en el interior del atomizador, se descompone dando lugar a NO y NO₂. Esto se traducía, directamente, en un aumento de la formación de OE en los productos desecados. Sobre este punto, existen una serie de trabajos que evidencian que los óxidos de nitrógeno (NO_x) pueden actuar como iniciadores de la autooxidación del colesterol (Sevanian *et al.*, 1979; Smith, 1981) y de los ácidos grasos insaturados (Pryor y Lightsey, 1981).

Como otro ejemplo de las repercusiones de los tratamientos tecnológicos sobre la formación de OE, podría citarse una cuestión relacionada con la elaboración de ovoproductos y tendente a prevenir el desarrollo de pardeamientos. Por esta razón, para ciertas aplicaciones, la yema de huevo en polvo debe estar exenta de glucosa. Esto se puede conseguir mediante un tratamiento enzimático, que consiste en añadir el sistema glucosa oxidasa-catalasa más agua oxigenada sobre el huevo líquido. Los enzimas se dejan actuar sobre la glucosa y se procede a la deshidratación, generalmente por atomización, con el fin de obtener huevo en polvo libre de glucosa. Este proceso puede incidir en la formación de OE, ya que se ha demostrado (Smith, 1981) que el peróxido de hidrógeno favorece la formación de epóxidos del colesterol (α -CE y β -CE).

En vista de esto, Morgan y Armstrong, en 1987, estudiaron la formación de colesterol epóxidos (CEs) en yema de huevo en polvo, obtenida por atomización con fuente de calor indirecta, a partir de yema de huevo líquida, a la que se habían adicionado diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se pudo observar que esta adición provocaba un aumento considerable del nivel de CEs en el producto así obtenido. Además, dicho nivel se disparaba de forma clara a lo largo del almacenamiento de este producto, a causa de su contenido en H₂O₂ residual.

Otro sistema de secado estudiado es el que utiliza rodillos calientes. En este caso se ha observado, para la obtención de leche en polvo, que la formación de OE es similar a la que tiene lugar cuando se usa la atomización con fuente de calor indirecta (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988).

Existen otros muchos estudios referentes a la tecnología utilizada en la obtención de derivados lácteos. Sander *et al.* (1988) estudiaron la evolución de los contenidos de OE durante diferentes fases de elaboración de la mantequilla y queso Cheddar, observando que las variaciones no eran significativas. Cleveland y Harris (1987) no detectaron la presencia de OE en leche entera pasteurizada, leche UHT, leche evaporada y leche desnatada, pero sí en la leche desnatada en polvo. En diferentes estudios (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988a; Sander *et al.*, 1989) se ha observado que los quesos rallados y en polvo presentaban niveles más elevados de OE.

Por último, entre la población india de todo el mundo es muy apreciada la mantequilla clarificada (ghee). Esta mantequilla, de forma casera, se obtiene calentando en un recipiente mantequilla normal a 150 °C durante 20-25 minutos. Industrialmente, existen otros procesos para clarificar la mantequilla que no exigen un calentamiento tan exhaustivo. Este sencillo método casero implica una notable formación de OE (Jacobson, 1987; Prasad y Subramanian, 1992).

6.PROCESOS DE FRITURA Y COCCIÓN.

Como es sabido, las grasas utilizadas en procesos de fritura sufren una serie de cambios oxidativos, debidos al efecto combinado de las altas temperaturas y de la presencia de oxígeno. Esto ha sido citado, en relación con el colesterol, para los sebos empleados como medio de fritura (Bascoul *et al.*, 1985, 1986a; Park y Addis, 1986a, b; Pearson *et al.*, 1983; Ryan, 1982; Ryan *et al.*, 1981, Yan y White, 1990). En este sentido, diferentes autores han analizado la formación de oxiesteroles, sometiendo dichos productos a diferentes temperaturas, de las usualmente aplicadas en los procesos de fritura. Con ello se ha comprobado que, a temperaturas que oscilan entre 135 °C-165 °C, la formación de ciertos OE es creciente con el tiempo de calefacción, mientras que por el contrario, a temperaturas superiores a 180 °C, los niveles de OE detectados, con períodos de calefacción largos, son muy bajos o bien nulos (Park y Addis, 1986a, b). Esto es debido a que a medida que aumenta la temperatura se va acentuando cada vez más el predominio de la descomposición térmica del colesterol sobre su oxidación (Park y Addis, 1986a, b). En relación con este tema, Zhang y Addis (1990) observaron una correlación significativa entre la formación de OE en un medio de fritura a base de sebo y la medida de las propiedades dieléctricas en este medio. Estos trabajos tienen gran importancia, pues se ha observado que los OE formados durante el proceso de fritura pueden absorberse en los alimentos que se someten a dicho proceso. Así, Ryan (1982) observa que el nivel de OE presente en patatas fritas es cuatro veces superior al que se encuentra en su medio de fritura. Recientemente, Zhang *et al.* (1991) estudiaron durante un período de 30 días el contenido de OE en las patatas fritas de dos restaurantes de comida rápida. Los resultados de este estudio fueron que las patatas contenían niveles apreciables de OE, los cuales oscilaban a lo largo de los 30 días. Esta variabilidad en el contenido de los OE a lo largo del período estudiado pone de manifiesto la necesidad de controlar la calidad de los medios de fritura, desde este punto de vista. En este mismo sentido, Lee *et al.* (1985) detectaron la presencia de oxiesteroles en patatas fritas procedentes de cinco restaurantes de comida rápida.

Otro de los productos usados como medio de fritura, aunque con menor frecuencia, es la mantequilla. Sobre este producto también se han efectuado estudios para determinar como evolucionan sus niveles de OE cuando es sometido a temperaturas elevadas. Uno de los más

significativos es el realizado por Sander *et al.* (1989), en el que se sometió mantequilla, durante 24 días, a un calentamiento continuo a 110 °C y se analizaron los niveles de OE a lo largo de este período. Se observó un claro aumento, hasta el octavo día, de los siguientes oxisteroles: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC. A partir de este punto, aunque el 7-CC siguió aumentando, los otros cuatro OE disminuyeron o bien se estabilizaron. Durante este estudio se detectaron, además, bajas concentraciones de 25-HC y CT. Otro trabajo de gran importancia es el de Csiky (1982), que consistió en someter mantequilla a 180 °C durante cinco o diez minutos, con lo cual observó que la misma pasaba de contener solamente trazas de 25-HC, a presentar niveles apreciables de: 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, 7-CC y 4 β -HC. Más recientemente, diferentes trabajos han incidido en el tema (Nourooz-Zdeh y Appelqvist, 1988a; Pie *et al.*, 1990) llegando a idénticas conclusiones. Según esto, parece que calentamientos superiores a 170 °C por espacio de 5-10 minutos son suficientes para inducir la formación de OE en la mantequilla.

Por último, Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1989) observaron que la fritura de bacon implicaba la formación de OE.

En este apartado podemos introducir la cocción, que es otro de los procesos que influyen en la formación de OE. De Vore (1988) estudio los niveles de 7-CC en carne de buey cruda y cocida en microondas, comprobando que la conservación durante cuatro días de estas dos carnes implicaba un aumento mucho mayor del contenido del compuesto estudiado en la carne cocida. Park y Addis (1987) observaron que la cocción de carne de buey inducía la formación de OE. Más tarde, en 1991, Pie *et al.* estudiaron como influían diferentes sistemas de cocción, sobre la formación de OE en carnes de buey ternera y cerdo, observándose que producían un aumento en el contenido de OE.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Addis, P.B. y Park, S.W. (1992). Cholesterol oxide content of foods. En *Biological effects of cholesterol oxides* (S.K. Peng y R.J. Morin, Ed.). p. 71-88. CRC Press, Boca Raton-Ann Arbor-Londres.

Bascoul, J., Domergue, N. y Crastes de Paulet, A. (1985). Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in dietary fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 623a.

Bascoul, J., Domergue, N., Mourot, J., Debry, G. y Crastes de Paulet, A. (1986a). Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 α -epoxy-5 α -cholesta-3 β -ol by the male Wistar rat. *Lipids* **21**, 744-747.

Bascoul, J., Domergue, N., Olle, M. y Crastes de Paulet, A. (1986b). Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids* **21**, 383-387.

Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1941). Autoxydation of sterols in colloïdal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol. *J. Biol. Chem.* **141**, 597-610.

Cleveland, M. Z. y Harris, N.D. (1987). Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. *J. Food Prot.* **50**, 867-871.

Csallany, A. S., Kindom, S. E., Addis, P. B. y Lee, J-H. (1989). HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. *Lipids* **24**, 645-651.

Csiky, I. (1982). Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by absorption high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **24**, 381-389.

Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968a). Photoxidation of cholesterol in spray-dried egg yolk upon irradiation. *J. Food Sci.* **3**, 581-587.

Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968b). Isolation and characterization of cholesterol-5 β ,6 β -oxide from an aerated aqueous dispersion of cholesterol. *Lipids* **3**, 335-339.

De Vore, V.R. (1988). TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef. *J. Food Sci.* **53**, 1058-1061.

Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1991). Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.* **56**, 843-847.

Finocchiaro, E.T., Lee, K. y Richardson, T. (1984). Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 877-883.

Finocchiaro, E.T. y Richardson T. (1983). Sterol oxides in foodstuffs: a review. *J. Food Prot.* **46**, 917-925.

Fioriti, J.A. y Sims, R.J. (1967). Autoxidation products from cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **44**, 221-224.

Fontana, A., Antoniazzi, F., Cimino, G., Mazza, G., Trivellone, E. y Zanone, B. (1992). High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J. Food Sci.* **57**, 869-879.

Herian, A.M. y Lee, K. (1985). 7 α - and 7 β -hydroxycholesterols formed in a dry egg nog mix exposed to fluorescent light. *J. Food Sci.* **50**, 276-277.

Higley, N.A., Taylor, S.L., Herian, A.M. y Lee, K. (1986). Cholesterol oxides in processed meats. *Meat Sci.* **16**, 175-188.

Hwang, K.T. y Maerker, G. (1993a). Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 371-375.

Hwang, K.T. y Maerker, G. (1993b). Determination of 6-ketocholestanol in unirradiated and irradiated chicken meats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 789-792.

Jacobson, M.S. (1987). Cholesterol oxides in indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in indian immigrant populations. *Lancet Septiembre* **19**, 656-658.

Karel, M. (1980). Lipid oxidation secondary reactions and water activity of foods. En *Autoxidation in food and biological systems*. (M.G. Simic y M. Karel, Ed.). p. 191. Plenum Press, Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.

Lee, K., Herian, A.M. y Higley, A. (1985). Sterol oxidation products in french fries and in stored potato chips. *J. Food Prot.* **48**, 158-161.

Luby, J.M., Gray, J.I., Harte, B.R. y Ryan, T.C. (1986). Photooxidation of cholesterol in butter. *J. Food Sci.* **51**, 904-923.

Maerker, G. y Jones, K.C. (1992). Gamma-irradiation of individual cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 451-455.

Missler, S.R., Wasilchuk, B.A. y Merritt, C. (1985). Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. *J. Food Sci.* **50**, 595-598, 646.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1987). Formation of cholesterol-5,6-epoxides during Spray-drying of egg yolk. *J. Food Sci.* **52**, 1224-1227.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1989). Wide-bore capillary gas chromatographic method for quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder. *J. Food Sci.* **54**, 427-429, 457.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1992). Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *J. Food Sci.* **57**, 43-45, 107.

Naber, E.C., Allred, J.B., Winget, J. y Stock, A.E. (1985). Effect of cholesterol oxidation products on cholesterol metabolism in laying hen. *Poult. Sci.* **64**, 675-680.

- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1987). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* **52**, 57-62, 67.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988a). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Butter and cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1635-1641.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988b). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Milk powder products. *J. Food Sci.* **53**, 74-79, 87.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1989). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Lard and bacon. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 586-592.
- Oshima, T., Li, N. y Koizumi, C. (1993). Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 595-600.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1985). HPLC determination of C-7 oxidized Cholesterol derivatives in foods. *J. Food Sci.* **50**, 1437-1441, 1444.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986a). Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 653-659.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986b). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J. Food Sci.* **51**, 1380-1381.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1987). Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *J. Food Sci.* **52**, 1500-1503.
- Pearson, A.M., Gray, J.I., Wolzak, A.M. y Horenstein, N.A. (1983). Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *J. Food Tehnol.* **37**, 121-129.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1990). Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: Identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 973-979.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1991). Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 250-254.
- Prasad, C.R. y Subramanian, R. (1992). Qualitative and comparative studies of cholesterol oxides in commercial and home-made indian ghees. *Food Chem.* **45**, 71-73.
- Pryor, W.A. y Lightsey, J.W. (1981). Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: Initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. *Science* **214**, 435-437.
- Rankin, S.A. y Pike, O.A. (1993). Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in a aqueous model system. *J. Food Sci.* **58**, 653-655, 687.

- Ryan, T.C. (1982). Oxidation of cholesterol in heated tallow. En Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. A.M. Pearson, J.I. Gray, A.M. Wolzak y N.A. Horenstein. 1983. *J. Food Technol.* **37**, 121-129.
- Ryan, T.C., Gray, J.I. y Morton, I.D. (1981). Oxidation of cholesterol in heated tallow. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 305-308.
- Sander, B.D., Smith, D.E. y Addis, P.B. (1988). Effectes of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **71**, 3173-3178.
- Sander, B.D., Smith, D.E., Addis, P.B. y Park, S.W. (1989). Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. *J. Food Sci.* **54**, 874-879.
- Schulze, E. y Winterstein, E. (1904). Uber das verhalten des Cholesterins gegen des Lict. En Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of oxidation products in dairy products. B.D. Sander, D.E. Smith, P.B. Addis y S.W. Park. 1989. *J. Food Sci.* **54**, 874-879.
- Sevanian, A., Mead, J.F. y Stein, R.A. (1979). Epoxides as products of lipid autoxidation in rat lungs. *Lipids* **14**, 634-643.
- Smith, L.L. (1981). *Cholesterol autoxidation*. Plenum Press, Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1984). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Isolation and identification. *J. Food Sci.* **49**, 1245-1248.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *J. Food Sci.* **50**, 229-231, 237.
- Tsai, L.S., Ijichi, K., Hudson, C.A. y Meehan, J.J. (1980). A method for the quantitative estimation of cholesterol α -oxide in eggs. *Lipids* **15**, 124-128.
- Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-schuil, T.G. y Katan, M.B. (1988). Quantification of oxysterols in dutch foods: Egg products and mixed diets. *Lipids* **23**, 1079-1085.
- Yan, P.S. y White, P.J. (1990). Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 927-931.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. y Marinova, E.M. (1985). Autoxidation of sitosterol in lipid systems of different unsaturation degree. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 622a.
- Zhang, W.B. y Addis, P.B. (1990). Prediction of levels of cholesterol oxides in heated tallow by dielectric measurement. *J. Food Sci.* **55**, 1673-1675.

Zhang, W.B., Addis, P.B. y Krick, T.P. (1991). Quantification of 5α -cholestane- $3\beta,5,6\beta$ -triol and other cholesterol oxidation products in fast food french fried potatoes. *J. Food Sci.* **56**, 716-718.

Zubillaga, M.P. y Maerker, G. (1991). Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. *J. Food Sci.* **56**, 1194-1202.

II.C. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS OXIESTEROLES.

1. INTRODUCCIÓN.	47
2. CITOTOXICIDAD.	47
1. Citotoxicidad <i>in vitro</i>	48
2. Citotoxicidad <i>in vivo</i>	49
3. Actividad antitumoral	49
3. ATEROGÉNESIS.	51
1. Efectos sobre la permeabilidad vascular.	52
2. Efecto sobre la síntesis de prostaglandinas y sobre la agregación plaquetaria.	53
3. Citotoxicidad para las células musculares lisas vasculares.	54
4. Modificación de la funcionalidad del receptor LDL.	54
5. Acumulación de ésteres de colesterol y formación de las células espumosas. . .	56
6. Estudios <i>in vivo</i> en donde se induce experimentalmente la arteriosclerosis. . .	57
4. MUTAGÉNESIS Y CARCINOGENESIS.	60
5. EFECTOS SOBRE MEMBRANA.	63
6. INHIBICIÓN SOBRE LA HMG-COA REDUCTASA Y EFECTOS SOBRE OTROS ENZIMAS.	65
1. Efecto sobre la HMG-CoA reductasa.	65
1. Mecanismo de acción.	66
1. Inhibición de la síntesis del enzima.	68
2. Degradación del enzima.	69
3. Modificación del enzima.	70
4. Unión de los oxiesteroles a proteínas citosólicas.	70
2. Efecto sobre otros enzimas	71
7. RESÚMEN DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS OXIESTEROLES. . . .	73
8. BIBLIOGRAFÍA.	75

1.INTRODUCCIÓN.

Los oxisteroles (OE) son compuestos que presentan una serie de efectos biológicos y que se encuentran en el cuerpo humano con procedencia exógena o endógena (ver apartado II.A., páginas 11-20). Los efectos biológicos descritos para estos compuestos son:

- citotoxicidad;
- aterogénesis;
- mutagénesis y carcinogénesis;
- efectos sobre membrana;
- inhibición sobre la HMG-CoA reductasa y efectos sobre otras enzimas.

De todos estos efectos los más profundamente estudiados son la citotoxicidad, la aterogénesis y la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa. No obstante, algunos de ellos no están bien establecidos e incluso, en ciertos casos, son objeto de controversia.

2.CITOTOXICIDAD.

La citotoxicidad de los diferentes OE ha sido ampliamente estudiada *in vitro*. No obstante, existen también algunos trabajos en los que se estudia la citotoxicidad de estos compuestos *in vivo*.

La toxicidad de los OE a nivel celular radica en su capacidad para inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa lo cual implica una disminución en la síntesis de colesterol endógeno, compuesto que juega un papel crucial en la estabilidad de las membranas plasmáticas. Por otro lado, la incorporación de OE en las membranas plasmáticas afecta a su fluidez, funcionalidad y estabilidad, lo cual también explica la citotoxicidad de estos derivados.

2.1. CITOTOXICIDAD *IN VITRO*.

Se han realizado multitud de estudios sobre la toxicidad de los derivados oxidados del colesterol en cultivos celulares. En la mayoría de los casos las células utilizadas son de mamíferos. A pesar de que, se han ensayado diferentes condiciones de cultivo, la extrapolación de estos resultados al organismo humano es más que discutible.

Se ha comprobado en un gran número de estudios la toxicidad de un total de 28 derivados oxidados del colesterol en diferentes modelos celulares, datos que quedan recogidos en el trabajo de revisión de Smith y Johnson (1989). Entre todos estos estudios, solamente cabe reseñar los que, a nuestro juicio, presentan mayor interés. Así, por ejemplo, Kucuk *et al.* (1992) observaron que los OE inhibían la función lítica de las células NK de ratón en un cultivo celular. Los OE que manifestaron mayor actividad inhibitoria fueron los que presentaron la función oxigenada sobre los carbonos 5, 6, y 7, mientras que los que la presentaban sobre los carbonos 20 y 25 de la cadena lateral prácticamente no poseían este poder inhibitor. Según estas observaciones, el efecto inhibitor se diferenció en base a que la función oxigenada estuviera situada sobre el núcleo de colesterol o sobre su cadena lateral, lo cual seguramente fue debido a que el núcleo del colesterol se sitúa, dentro de la bicapa lipídica, más próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que provoca mayores cambios estructurales en la membrana plasmática. Otro de los estudios con conclusiones interesantes es el realizado por Brown y Goldstein (1974), en el cual se observó que, en un cultivo de fibroblastos humanos y en presencia de 7-CC, pero ausencia de lipoproteínas, se producía una inhibición de la síntesis de colesterol endógeno que implicaba una clara disminución en el crecimiento celular. Esta ausencia necesaria de lipoproteínas en el medio de cultivo, posiblemente se relaciona con el hecho comprobado de que los OE se unen a las lipoproteínas y una vez unidas a ellas no se incorporan con tanta facilidad a la membrana plasmática, con lo cual no manifiestan su citotoxicidad. No obstante, esto no niega el hecho, también ampliamente constatado, de que una disminución en el contenido de colesterol de la membrana celular provoca su inestabilización, con los consecuentes cambios de fluidez, permeabilidad y funcionalidad. La importancia del colesterol como constituyente de la membrana celular ha sido comprobada en multitud de preparaciones celulares entre las cuales cabe destacar las de eritrocitos (Chen *et al.*, 1974).

2.2.CITOTOXICIDAD *IN VIVO*.

Como ya hemos comentado, la extrapolación al organismo humano de los resultados de citotoxicidad obtenidos *in vitro* es más que discutible. A pesar de ello, se han realizado algunos estudios con bacterias, que presentan el mismo problema de extrapolación. Se ha demostrado la capacidad bactericida del 7 α -HC, 25-HC y 3 β -hidroxi-5 α -colest-6-en-5-hidroperóxido sobre *Salmonella typhimurium* (Ansari *et al.*, 1982; Yachnin *et al.*, 1982). En relación con el tema, también se ha constatado la capacidad bacteriostática del CT y 3 β -hidroxi-5 α -colest-6-ona sobre *Mycoplasma gallisepticum* (Herian *et al.*, 1985) y de otros OE sobre *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez *et al.*, 1983). A parte de estos estudios sobre microorganismos, se ha comprobado que la implantación subcutánea de CT, 25-HC o 26-HC en ratas conduce a necrosis y a una respuesta inflamatoria aguda (Harland *et al.*, 1973; Baranowski *et al.*, 1982).

2.3.ACTIVIDAD ANTITUMORAL.

La actividad citotóxica de los OE también se ha relacionado con la posible aplicación de estos compuestos como antitumorales, pues, se ha demostrado que muchos de estos compuestos inhiben el crecimiento de las células tumorales. La mayoría de los estudios sobre este punto se han realizado *in vitro*.

En relación con el tema, se ha observado que, *in vitro*, el 7 β -HC y su dihemisuccinato sódico son tóxicos para las células de rata del hepatoma de Morris (Hietter *et al.*, 1986; Luu, 1986; Rong *et al.*, 1985). Estos mismos compuestos poseen mayor capacidad protectora, *in vivo*, que diferentes fármacos antitumorales (ciclofosfamida, 5-fluorouracilo y metotrexato) contra los tumores de Krebs II en ratones (Luu, 1986; Rong *et al.*, 1985).

Referente también al 7 β -HC, resulta muy interesante la comprobación de que este compuesto es tóxico para los cultivos celulares de linfoma de ratón y no para los linfocitos normales de este mismo animal (Hietter *et al.*, 1986). Las concentraciones que ejercen un efecto tóxico sobre las células de linfoma son de 3-12 μ M, mientras que las concentraciones normales de este compuesto en sangre, descritas por diferentes autores, son mucho menores; por tanto no

sería lógico pensar en un efecto protector de este compuesto, *in vivo*, contra los linfomas. En relación con este punto, el 7 β -HC también es más tóxico sobre las células de hepatomas que sobre hepatocitos normales (Nordman *et al.*, 1989). En cualquier caso, los OE manifiestan su efecto citotóxico de forma preferente sobre células altamente proliferativas.

Recientemente, se han establecido programas para desarrollar derivados de los oxiesteroles con actividad antitumoral, utilizando para su bioensayo células de rata del hepatoma de Morris (Smith y Johnson, 1989).

Relacionado con la actividad antitumoral de los OE, un estudio muy interesante fue el realizado *in vivo*, sobre ratas, por Christ *et al.* (1991). En este trabajo se evaluó la actividad antitumoral de dos fosfodiésteres del 7 β -HC, solubles en agua, administrados intraperitonealmente a ratas en las que se habían implantado subcutáneamente células P815 de mastocitoma. Se observó una actividad antitumoral óptima de los fosfodiésteres cuando la dosis se situaba entre 20 y 40 mg/kg/día. Además, en los grupos tratados el crecimiento de las células tumorales siempre fue mucho más lento.

Los posibles mecanismos por los cuales los OE presentan actividad antitumoral son los ya expuestos con anterioridad: inhibición de la síntesis de colesterol endógeno e incorporación a la membrana plasmática de estos compuestos. No obstante, en algunos trabajos se ha concretado más sobre este mecanismo de acción. La HMG-CoA reductasa no sólo es una enzima clave en la síntesis de colesterol sino que también lo es en la síntesis de los alcoholes prenflícos (farnesil y geranil-geranil), alcoholes que al unirse a ciertos oncogenes provocan su activación (Schaffer *et al.*, 1989; Glomset *et al.*, 1990). Otro de los posibles mecanismos de acción de esta actividad antitumoral de los OE se relaciona con su capacidad para alterar el sistema inmunológico. Se ha comprobado que algunos OE consiguen atraer, *in vivo*, a macrófagos y neutrófilos (Moog *et al.*, 1990). Por otro lado, se ha observado que algunos OE inhiben las etapas primarias de la división de linfocitos, inducidas por mitógenos y aloantígenos (Christ *et al.*, 1991; Luu y Moog, 1991). Según otros autores los OE afectan esencialmente a la génesis y funcionalidad de las células K, inhibiendo la proliferación y transformación linfocitaria (blastogénesis), la respuesta linfocitaria combinada y la actividad de estas células K (Smith y Johnson, 1989). Los OE que han manifestado este tipo de acción

in vitro son, principalmente, 25-HC, 7-HCs y 7-CC. Otro posible mecanismo de acción surge del trabajo de Hwang (1992) en el que se observó que el 7-CC o el 25-HC eran capaces de disminuir considerablemente el número de células viables en cultivos de células de linfoma (EL4) y de leucemia (K36). No obstante, la presencia de estos OE junto con inhibidores de la síntesis de proteínas o de RNA incrementaba la viabilidad de estas células. Estas observaciones sugirieron que la toxicidad de los OE puede venir mediada por mecanismos que requieran la síntesis de proteínas o de RNA. Según esto, resultaría muy interesante descubrir qué proteínas se encuentran involucradas en la muerte celular producida por estos compuestos.

3. ATEROGÉNESIS.

El proceso aterosclerótico según fue descrito por Ross (1986), se inicia mediante una modificación en la función de barrera que posee el endotelio vascular, lo cual lleva a una penetración de lipoproteínas de baja densidad y plaquetas. A continuación, se liberan factores de crecimiento que inducen la proliferación y migración de las células musculares lisas subendoteliales de la íntima hacia la zona de endotelio afectada, tras ello, se produce una invasión de monocitos en la zona, los cuales son activados y se transforman en macrófagos. Los macrófagos incorporan y degradan las LDL, dando lugar a las células espumosas. El colesterol procedente de las LDL se acumula entre y dentro de las células espumosas, sobre todo cuando el nivel de LDL en sangre es elevado (figura 1).

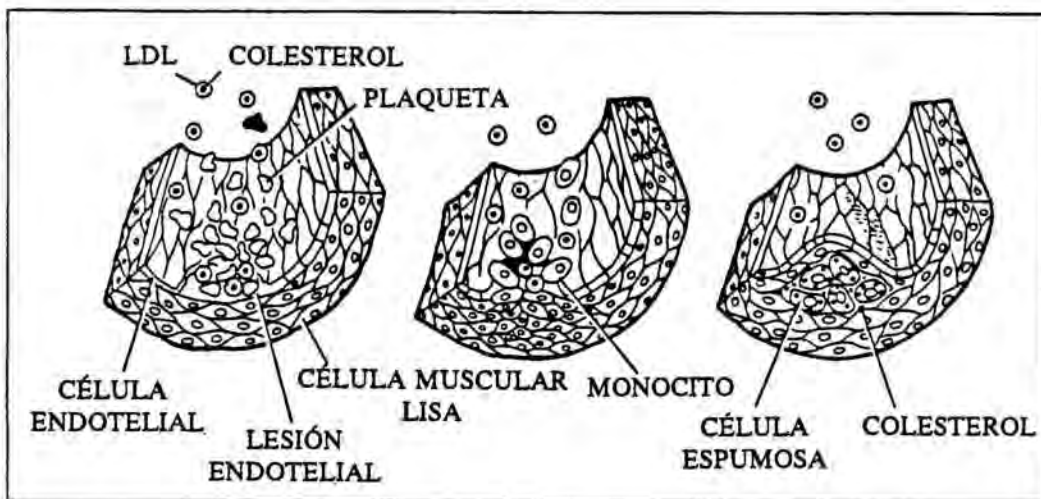


Figura 1-Evolución del proceso aterosclerótico (Hubbard et al., 1989)

La posterior acumulación del colesterol y sus ésteres, la proliferación de células musculares lisas de la capa media, la síntesis de colágeno y elastina y el depósito de otras sustancias como el calcio dan lugar a la formación de placas de ateroma.

Hasta el momento el punto más controvertido de esta teoría sobre el proceso aterosclerótico resulta ser su inicio. La incógnita se encuentra en conocer cual es el factor o factores que provocan la lesión a nivel endotelial y consecuentemente la modificación de la selectividad del endotelio como barrera. Este daño puede venir producido química o mecánicamente, así, los factores que han sido implicados en su producción son: virus, hipertensión y niveles elevados de LDL-colesterol en sangre. El endotelio también puede ser alterado por la nicotina, toxinas bacterianas, proteasas, lipasas, histamina y derivados oxidados de los lípidos que en el caso en que nos ocupa son los que nos interesan, especialmente los OE (Hubbard *et al.*, 1989).

In vitro, se han demostrado diferentes actividades de los OE que pueden estar relacionadas con su posible capacidad aterogénica *in vivo* (Peng *et al.*, 1991):

- efectos sobre la permeabilidad vascular;
- efecto sobre la síntesis de prostaglandinas y sobre la agregación plaquetaria;
- citotoxicidad para las células musculares lisas vasculares;
- modificación de la funcionalidad del receptor LDL;
- acumulación de ésteres de colesterol y formación de las células espumosas.

Como mínimo una de estas de estas actividades se ha descrito para los siguientes compuestos: α -CE, β -CE, 7-HCs, 7-CC, CT, 25-HC, (25R)-26-HC y (25S)-26-HC. De todos estos OE con actividades *in vitro*, los más potentes son el CT y el 25-HC, estos dos compuestos presentan distintos efectos y su mecanismo de acción es diferente.

3.1.EFECTOS SOBRE LA PERMEABILIDAD VASCULAR.

Como hemos comentado, el endotelio vascular actúa a modo de barrera, presentando una permeabilidad selectiva para los componentes plasmáticos. *In vitro*, se observó que algunos

OE aumentaban la transferencia de albúmina a través de cultivos, en forma de monocapa, de células endoteliales procedentes de arterias pulmonares porcinas (Boissonneault, 1991a). Los OE ensayados fueron, CEs, 7-HCs, 25-HC, CT y 7-CC. De estos OE, el más activo aumentando la transferencia de albúmina fue el CT y los menos activos los CEs, mientras que el colesterol no presentó actividad. En otro estudio de Boissonneault *et al.* (1991b) se comprobó que el CT unido a LDL humanas y de conejo también presentaba este efecto. Esta comprobación podría explicar al hecho de que niveles elevados de LDL en plasma sean un factor de riesgo para las enfermedades coronarias, pues, las LDL unidas a productos de oxidación del colesterol posiblemente modifican la selectividad de la barrera endotelial vascular, produciendo un aumento de la penetración en la pared arterial de componentes plasmáticos como pueden ser las LDL.

3.2.EFECTO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS Y SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA.

La prostaciclina (PGI₂) se sintetiza, entre otras, en las células endoteliales y es esencial para el mantenimiento de la integridad vascular (Weksler *et al.*, 1977). Una disminución en su síntesis potencia la agregación plaquetaria y la formación de trombos. Ya en 1983, Peng *et al.* observaron que el CT en células de músculo liso aórtico de conejo inhibía la biosíntesis de prostaglandinas. En cultivos de células endoteliales vasculares humanas expuestas a colesterol, 25-HC y CT (10 µg/ml medio de cultivo) se observó que la producción de PGI₂ fue inhibida un 46% por el CT y un 60% por el 25-HC. En este estudio, también se observó que el α-tocoferol evitó el efecto inhibitor de estos dos OE (Peng *et al.*, 1990). Hu *et al.* (1990) observaron que una disminución en la producción de PGI₂, por parte de las células endoteliales, favorecía la adhesión de las plaquetas a estas células.

Los OE no sólo suprimen la producción de PGI₂ favoreciendo la adhesión de las plaquetas al endotelio; sino que como consecuencia de esta unión se liberan una serie de factores de crecimiento, los cuales posiblemente provocan una migración y proliferación de las células musculares lisas de la íntima (Ross, 1986, 1987).

No obstante, en el tejido aórtico de ratas alimentadas con una dieta rica en OE hasta 24 horas antes de su sacrificio, se ha observado un ligero aumento en la biosíntesis de prostaciclina (Martínez-Sales *et al.*, 1985)

3.3. CITOTOXICIDAD PARA LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.

De todas las actividades *in vitro*, la más claramente relacionada con el proceso aterogénico es la citotoxicidad de algunos de estos compuestos (β -CE, 7-CC, CT y 25-HC) sobre las células musculares lisas aórticas humanas y de animales (Guyton *et al.*, 1990; Naseem y Heald, 1987; Peng *et al.*, 1977; Taylor y Peng, 1985). Esta actividad está relacionada con la capacidad, *in vivo*, de algunos OE (7-CC, CT y 25-HC) para inducir la formación de lesiones ateromatosas. Uno de los estudios más interesantes sobre esta citotoxicidad es el llevado a cabo por Guyton *et al.* (1990), en el cual se estudia la citotoxicidad del CT, 25-HC y colesterol sobre células musculares lisas aórticas de perro. El experimento de Guyton y sus colaboradores consistió en cubrir, mediante un gel de colágeno, depósitos cristalinos de los tres compuestos, sobre los cuales se sembraron células musculares lisas que se incubaron durante varias semanas. Se observó que los dos OE poseían efecto quimiotáctico positivo para las células musculares lisas y que, también, provocaban su muerte e inhibían su crecimiento. Al mismo tiempo, se constató la presencia de una zona relativamente próxima a los cristales de OE, donde la muerte celular era compatible con la total viabilidad de otras células del mismo tipo, lo cual, en cierto modo, sucede durante el proceso aterosclerótico. En este estudio también se observó que el colesterol y el 25-HC permanecían más tiempo en los cultivos celulares que el CT.

3.4. MODIFICACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR LDL.

Se ha comprobado que las LDL, tras unirse a sus correspondientes receptores de membrana, son incorporadas y metabolizadas por diferentes células del cuerpo humano: fibroblastos, células musculares lisas, linfocitos y células endoteliales (Goldstein y Brown, 1977). Se ha demostrado que una disminución o alteración en la funcionalidad de los receptores para las LDL da lugar a una hipercolesterolemia, a un aumento de la acumulación de colesterol en los macrófagos y a una predisposición para el proceso aterosclerótico (Goldstein *et al.*,

1983). Normalmente, las células regulan el número de sus receptores LDL, controlando de esta forma la entrada de colesterol necesario para la síntesis de su membrana. Los OE, entre los múltiples efectos que presentan a nivel de membrana celular, también alteran la funcionalidad de los receptores LDL.

Ya en 1975, Brown y Goldstein demostraron que el 25-HC disminuía la incorporación de las LDL, mediada por sus receptores, en fibroblastos humanos. Más tarde, en 1984, Fornas *et al.* observaron lo mismo en macrófagos J774. En relación con este punto, Lorenzo *et al.*, en 1987, demostraron que el 26-HC inhibía específicamente la unión, incorporación y degradación de las LDL en fibroblastos humanos. Este efecto fue dosis-dependiente y se manifestó de forma significativa a una concentración de 1 μM , no muy diferente de las concentraciones observadas en suero humano (0.23-0.64 μM). Al mismo tiempo, el 26-HC produjo una reducción en el número de receptores para las LDL pero no un cambio de afinidad de estos por el ligando.

No obstante, el 25-HC presenta otras acciones relacionadas con el tema, como la capacidad para aumentar la unión de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a los fibroblastos y células musculares lisas arteriales humanas (Oram *et al.*, 1981). Por otro lado, la exposición de células endoteliales bovinas a 25-HC conlleva un aumento en el número de receptores para las HDL. Este aumento es dependiente del tiempo y temperatura. 48 después de la exposición a este compuesto, se presentó un máximo en el número de receptores HDL. Estos receptores HDL también se unieron a LDL. De esta manera, las LDL no se incorporaron mediante sus propios receptores, implicando una reducción del 90% en su degradación. Según esto, es posible que los OE no solamente conlleven una disminución del número de receptores LDL, sino que también estimulen la síntesis de receptores HDL, lo cual también da como resultado una disminución en la incorporación de las LDL.

Los OE que intervienen en el metabolismo celular del colesterol, modificando la funcionalidad de los receptores LDL, son: CEs, CT, 7-CC, 25-HC y 26-HC. El mecanismo de acción por el que se produce esta acción de los OE no se ha elucidado totalmente hoy en día. Parece ser que en este mecanismo interviene la unión de estos compuestos a una proteína citosólica (Taylor *et al.*, 1984). Por otro lado, también se ha postulado que los OE inhiben

la transcripción de RNAm de ciertas enzimas que intervienen en la síntesis de estos receptores.

3.5.ACUMULACIÓN DE ÉSTERES DE COLESTEROL Y FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS ESPUMOSAS.

Los derivados oxidados del colesterol, posiblemente, también actúan a nivel de la acumulación de ésteres del colesterol en diferentes células y en la formación de células espumosas. La incubación de monocitos/macrófagos humanos en un medio con elevada concentración de LDL no conlleva depósito de colesterol a nivel de estas células; esto es debido a que los receptores LDL sólo median la incorporación de las lipoproteínas necesarias para que no falte colesterol para la síntesis de membrana (Shechter *et al.*, 1981). Las LDL oxidadas pueden ser ingeridas por los monocitos en grandes cantidades mediante receptores inespecíficos, los cuales no están sujetos a una regulación retroactiva por parte del contenido intracelular del colesterol (Imai *et al.*, 1976); esto podría explicar, en parte, la acumulación de ésteres de colesterol en las células espumosas derivadas de los macrófagos.

En las lesiones ateromatosas, además de los monocitos/macrófagos, las células musculares lisas también presentan acumulación de ésteres de colesterol en su citoplasma. Se ha comprobado que en algunos cultivos celulares ciertos OE inducen un aumento en la esterificación del colesterol endógeno, produciéndose, de esta forma, un aumento de los ésteres de colesterol acumulados en estas células. Este aumento de la esterificación ha sido asociado a una activación de la acil CoA O-acetiltransferasa (ACAT). Drevon y Evensen (1984) observaron un aumento entre 6 y 46 veces de la esterificación del colesterol intracelular como respuesta a la exposición de fibroblastos a 25-HC y LDL. En relación con ello, Bates *et al.* (1983) comprobaron que, en células musculares lisas y fibroblastos, el aumento en la esterificación producido por lipoproteínas era inhibido por el 22-HC. Este compuesto también bloqueó la inducción de la esterificación del colesterol producida por el 25-HC. Los ésteres de colesterol contenidos en cultivos de hepatocitos, procedentes de conejos con una dieta rica en OE, fueron claramente superiores a los de los hepatocitos control, procedentes de conejos con una dieta rica en colesterol (Kosykh *et al.*, 1989). En células musculares lisas vasculares de conejo se observó que el 25-HC activaba la ACAT, pero no la colesterol éster hidrolasa, lo cual muy posiblemente predispone a la acumulación,

en estas células, de ésteres del colesterol (Morin y Peng, 1989). Estos cuatro trabajos son un ejemplo de los múltiples estudios en los que se ha constatado que ciertos OE estimulan la actividad de la ACAT en diferentes modelos celulares (Smith y Johnson, 1989)

Por otro lado, también *in vitro*, el CT provoca una disminución de la actividad endocitótica, en los cultivos de células endoteliales de conejo (Sentovich, *et al.*, 1985).

3.6. ESTUDIOS *IN VIVO*: INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LA ATEROSCLEROSIS.

El efecto aterogénico se ha demostrado, *in vivo*, para varios OE (25-HC, CT, CEs y 7-CC) (Imai y Nakamura, 1980; Jacobson *et al.*, 1985; Matthias *et al.*, 1987; Taylor y Peng, 1985; Toda *et al.*, 1981). En el caso del α -CE existen opiniones contrapuestas en relación a esta acción, ya que mientras algunos investigadores consideran que el compuesto es aterogénico *per se* (Imai *et al.*, 1976, 1980), otros en cambio, como Missler *et al.* (1985), atribuyen esta propiedad de forma exclusiva a su producto de hidrólisis, que no es otro que el CT, compuesto en el que sí hay acuerdo sobre sus propiedades aterogénicas (Imai *et al.* 1980; Jacobson *et al.*, 1985; Matthias *et al.*, 1987; Peng *et al.*, 1985b). Este hecho enunciado por Missler *et al.* en 1985, ya había sido puesto de manifiesto anteriormente, como una posibilidad, por Peng *et al.* (1982a). Por otra parte, en diversos trabajos, se han encontrado en el suero de personas hipercolesterolémicas concentraciones anormalmente altas de α -epóxido, que no se observan en individuos que no padecen esta afección (Gray *et al.*, 1971). Estudios como el de Imai *et al.* (1980), en el que se demuestra que la inyección intravenosa de 25-HC, CT, CEs o 7-CC induce la formación de lesiones en las arterias pulmonares de conejos y que la inyección de colesterol puro, en las mismas condiciones, no da lugar a estas lesiones, son las que llevan a postular la teoría de que el colesterol no es aterogénico *per se*, sino que son los OE los inductores de las lesiones ateromatosas. Los cambios morfológicos inducidos por los OE a nivel arterial pueden apreciarse muy bien mediante el microscopio electrónico de barrido. Peng *et al.* (1985b) estudiaron estos cambios a nivel endotelial, para ello tomaron tres grupos de conejos: a uno de ellos le inyectaron por vía intravenosa 25 mg/kg de CT, a otro la misma dosis de 25-HC y al tercero únicamente el vehículo. 24 horas después de la inyección los conejos fueron sacrificados y se examinaron sus aortas, tanto en el grupo del CT como en el del 25-HC se observaron muchas más

lesiones a nivel endotelial que en el grupo control, en donde se apreciaron muy pocas. Los resultados de este estudio están de acuerdo con la teoría que postula que los OE inician el proceso aterosclerótico produciendo un daño a nivel endotelial. En otros estudios se han administrado OE durante períodos más largos de tiempo y se han relacionado estos compuestos con cambios celulares que se producen en fases más avanzadas del proceso aterosclerótico (Imai y Nakamura, 1980; Imai *et al.*, 1980; Matthias *et al.*, 1987; Peng *et al.*, 1982c). Por otro lado, en un estudio de Blankenship *et al.* 1991 se observó que, tras la administración a ratas de una dieta adicionada de CT, este compuesto se acumulaba en su tejido aórtico torácico y provocaba un cambio en la composición aminoacídica de su elastina. No obstante, el tema es muy controvertido, pues, hay que tener en cuenta que las dosis de OE utilizadas para estos estudios son muy elevadas y que en algunas ocasiones se utilizan mezclas de OE de composición incierta. Además, en un estudio de Imai y Lee (1983) se administraron a conejos dos dietas diferentes durante 7-14 meses. Las dos dietas contenían un 1% de colesterol y sólo diferían en que una de ellas contenía, además, 0.5 mg de 25-HC por día. La observación de las lesiones aórticas de los conejos no indicó influencia alguna del 25-HC. Por otro lado, cabe tener en cuenta que la aterosclerosis es un proceso muy lento en el ser humano y mucho más rápido en los animales de experimentación, con lo que la extrapolación de los resultados obtenidos en estos animales al hombre es muy poco fiable.

No obstante, lo que si esta claro es que algunos OE (CEs, 25-HC y 26-HC) han sido aislados de lesiones ateromatosas humanas (Gilbert *et al.*, 1972; Jacobson *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1979; Smith y Van Lier, 1970; Van Lier y Smith, 1967). Diferentes OE (α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, 7-CC, 26-HC, 20-HC) también han sido aislados de sangre humana, principalmente de sus lipoproteínas plasmáticas. Referente al tema, se ha observado que los OE se distribuyen de forma diferente en función del tipo de lipoproteína. Así, el análisis de lipoproteínas plasmáticas humanas indicó que el 7-CC y los CEs se presentaban en las LDL; mientras que el 26-HC lo hacía en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDL y HDL; y el 7α -HC, 25-HC y 20-HC lo hacían básicamente en LDL y HDL (Brooks *et al.*, 1983, 1985; Streuli *et al.*, 1981). No obstante, esta distribución según un trabajo, más reciente, de Addis *et al.* (1989), es la siguiente: el α -CE se distribuye más o menos uniformemente entre las HDL, LDL y VLDL; el β -CE y el 7-CC se encuentran también en los tres tipos de lipoproteínas pero mayoritariamente en las LDL; el 7β -HC se distribuye

entre HDL y LDL; y el 25-HC y CT sólo se encuentran en las LDL. La irregular distribución de los OE en las lipoproteínas plasmáticas también se constató en animales de experimentación, así, por ejemplo, en monos, el 25-HC se distribuyó básicamente en las VLDL y LDL y, en conejos, los C-7 OE y el CT lo hicieron selectivamente en las VLDL, al igual que el 25-HC en LDL (Peng *et al.*, 1980, 1982b, 1986, 1987). No obstante, cabe tener en cuenta que se desconoce la importancia de esta distribución diferenciada. En relación con este punto, se plantea la cuestión de si los OE unidos a lipoproteínas plasmáticas presentan propiedades aterogénicas o no. La respuesta presumiblemente la dió el estudio de Bernheimer *et al.* (1987). En este trabajo se inyectaron en conejos LDL previamente tratadas con colesterol oxidasa, con lo cual se desarrollaron graves lesiones ateromatosas en estos animales.

Según todo esto, no está tan claro que los OE sean inductores de la aterosclerosis.

Krut (1982a, b) relacionó los OE con la aterosclerosis bajo otro punto de vista. Este autor observó el poder solubilizante que ejerce el colesterol tanto *in vitro* como *in vivo* y lanzó la hipótesis de que los OE podrían prevenir la acumulación de colesterol, en las paredes arteriales y así poseer un efecto antiaterogénico. De hecho esta hipótesis podría explicar la observación de que una dieta con OE parece evitar la formación de lesiones ateromatosas en conejos (Tipton *et al.*, 1987a, b). En posible relación con estos resultados, Griminger y Fisher (1986) observaron que las lesiones ateromatosas en pollos eran mucho más graves con una dieta a base de huevo fresco que cuando la dieta era a base de huevo en polvo (notable contenido en OE) o a base de soja y sin colesterol. En estos dos últimos casos la influencia de la dieta sobre las lesiones fue prácticamente idéntica. En la misma línea, Higley *et al.* (1986) observaron que la administración a conejos durante 11 semanas de una dieta con una cantidad fija (166 mg/kg/día) de una mezcla de OE (7-CC + 7 α -HC + CEs) era menos aterogénica que la misma dieta con esta cantidad fija de colesterol puro.

Finalmente, para contribuir todavía más a la controversia, uno de los trabajos que implican más claramente a los OE con el proceso aterogénico es un estudio epidemiológico realizado en Londres con inmigrantes indios, quienes presentaron una mortalidad mucho más elevada de lo esperada por procesos ateroscleróticos (Jacobson, 1987). La población estudiada no se

caracterizó por presentar factores de riesgo para el proceso aterosclerótico. Un factor común a esta población fue el consumo de mantequilla clarificada o ghee (apartado II.B.5., página 36), producto que contiene niveles apreciables de OE (Jacobson, 1987; Prasad y Subramanian, 1992). Este estudio sugirió que los OE presentes en este tipo de la mantequilla pueden suponer un factor de riesgo en los procesos ateroscleróticos.

4.MUTAGÉNESIS Y CARCINOGENÉESIS.

En diferentes estudios se ha comprobado que las mezclas de oxisteroles son mutagénicas para cepas de *Salmonella typhimurium* TA1537, TA1538 y TA98 (test de Ames). No obstante, en estos estudios no se han identificado los OE con propiedades mutagénicas (Ansari *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1986). Sin embargo, la mutagenicidad ha sido demostrada específicamente para algunos OE en cultivos bacterianos y de células de mamíferos. Así, se observó que el 7α -hidroperóxido (7α -HPC) y el 5α -hidroperóxido de colesterol (5α -HPC) poseen propiedades mutagénicas frente a la cepa TA1537 de *S.typhimurium*. Esta cepa metabolizó los dos hidroperóxidos, transformando el 7α -HPC en 7-CC y 7α -HC; estos dos compuestos no resultaron ser mutagénicos. El 5α -HPC fue isomerizado a 7α -HPC y también reducido a 5α -colest-6-en- 3β ,5-diol y transformado, al parecer directamente, en 7-CC (Smith *et al.*, 1986, 1987). Además, estos hidroperóxidos posiblemente no son aterogénicos *per se*, pues, la catalasa y la superóxido dismutasa inhiben y activan, respectivamente, la capacidad mutagénica de estos dos hidroperóxidos sobre esta cepa de *S.typhimurium*. Estos resultados hacen pensar en especies activas del oxígeno como mutagénicas, este es el caso del anión peróxido (O_2^-) generado por la superóxido dismutasa a partir del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual, a su vez, se ha formado por reducción del oxígeno que puede ser estimulada por los hidroperóxidos del colesterol (figura 2). Este anión peróxido muy posiblemente es el agente mutagénico y su acción es inhibida por la catalasa. Esta hipótesis viene respaldada por el hecho de que el peróxido de hidrógeno es ligeramente mutagénico sobre varias cepas de *S. typhimurium* TA100 (Mitchell, 1980; Winkvist *et al.*, 1984) y TA102 (Levin *et al.*, 1982; Ruiz-Rubio *et al.*, 1985; De Flora *et al.* 1984). Otra posible interpretación de la mutagenicidad del 7α -HPC y 5α -HPC es que estos compuestos interaccionen con el anión peróxido y den lugar a un mutágeno. Esta interacción vendría inhibida por la catalasa (figura 2).

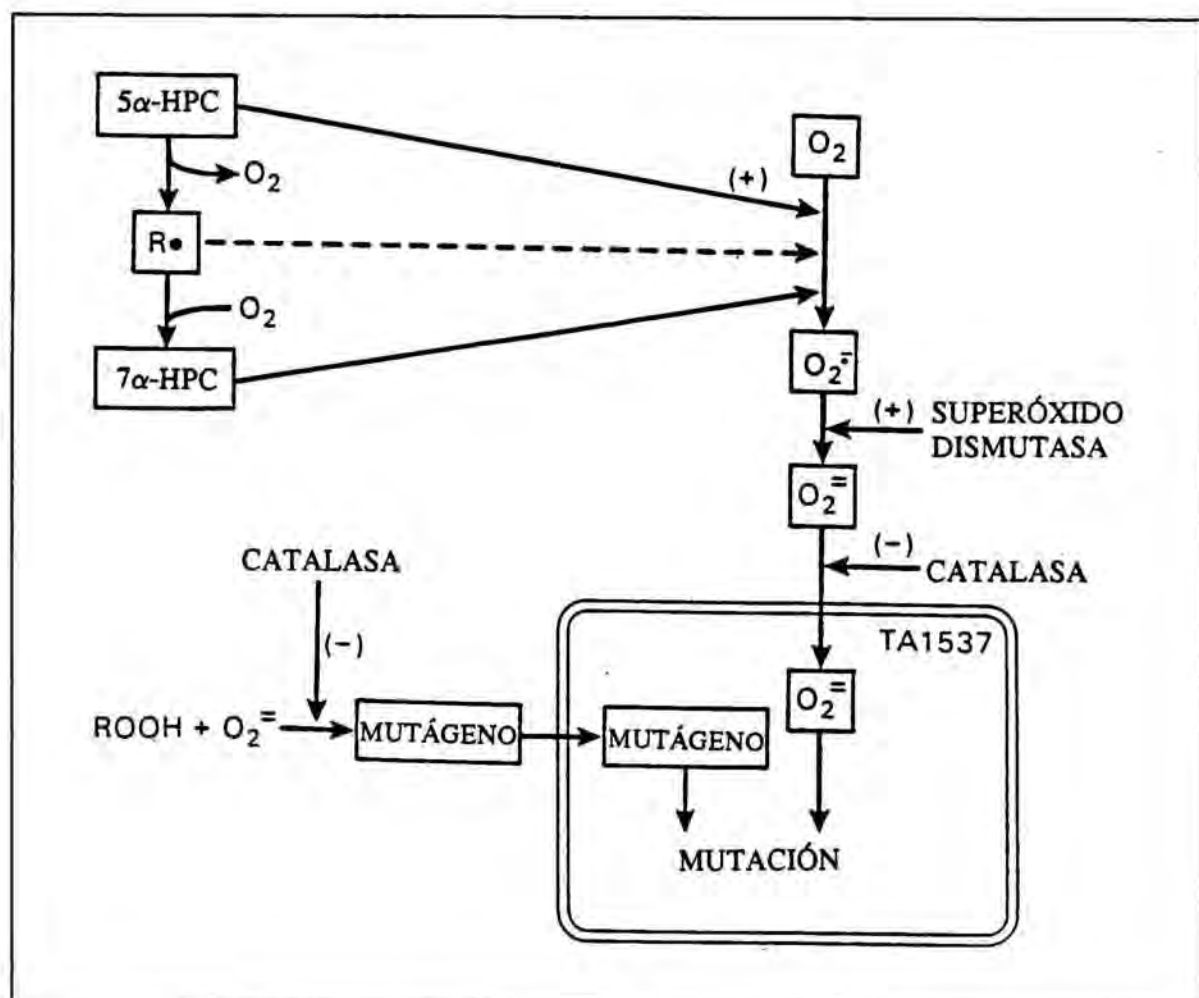


Figura 2-Posibles procesos implicados en la mutagenicidad de los hidroperóxidos del colesterol. Símbolos: 5α-HPC, 5α-hidroperóxido del colesterol; 7α-HPC, 7α-hidroperóxido del colesterol; R•, radicales del colesterol intermedios entre los dos hidroperóxidos; TA1537, *Salmonella typhimurium* TA1537; ROOH, hidroperóxidos del colesterol (Smith y Johnson, 1989).

Se ha comprobado que lípidos procedentes de aortas humanas (Johnson y Smith, 1983, 1984) y de lipoproteínas de muy baja densidad (Rueff y Halpern, 1985) presentan mutagenicidad para bacterias, pero se desconoce si los agentes mutágenos son derivados oxidados de los AGI, del colesterol o bien otros compuestos presentes en estas fracciones. También se ha comprobado la mutagenicidad (Blackburn *et al.*, 1979; Sevanian y Peterson, 1984) para el colesterol-5α,6α-epóxido, pero en este caso los resultados experimentales son discutidos por otros autores (Ansari *et al.*, 1982; Glatt *et al.*, 1983; Kadis, 1978; Kelsey y Pienta, 1979; Smith *et al.*, 1979). Sevanian y Peterson (1986) comprobaron que el β-CE era incluso más

mutagénico que su epímero. Los CEs se hidrolizan dando lugar al CT, compuesto que no es mutagénico. Estos tres compuestos inhiben la incorporación de timidina al DNA (CT > β -CE > α -CE) (Sevanian y Peterson, 1984, 1986). La inhibición de la síntesis de DNA por parte de diferentes OE (7α -HC, 7β -HC, 7-CC, 22R-HC, 22S-HC, 24R-HC, 24S-HC, 25-HC, (25R)-26-HC) ha sido puesta de manifiesto en un total de más de 15 estudios recogidos por Smith y Johnson (1989). Uno de los posibles mecanismos de acción por el cual estos OE inhiben la síntesis de DNA es el aumento de la entrada de Ca^{++} a través de la membrana (Moog *et al.*, 1986), efecto que ha sido comprobado para algunos OE en diferentes modelos celulares (apartado II.C.5., páginas 63-65).

Por otro lado, la actividad carcinogénica ha sido únicamente detectada, con una certeza casi absoluta, en el caso del colesterol- $5\alpha,6\alpha$ -epóxido. Bischoff, ya en 1969, comprobó que este compuesto administrado subcutáneamente inducía la formación de tumores en ratas y ratones. Más tarde, este producto se aisló de piel humana (Black y Lo, 1971; Chan y Black, 1974) y de ratones (Black y Douglas, 1972) irradiada con luz UV. En este último caso, se observó que un aumento en los niveles de α -epóxido se traducían rápidamente en un incremento de la incidencia del cáncer de piel en estos animales (Chan y Black, 1974). Este mismo equipo confirmó la existencia de esta relación causal en un trabajo posterior (Black y Chan, 1976). No obstante, no se conoce si además de α -CE en las pieles de los animales irradiados se forman otros compuestos, con lo cual la actividad carcinogénica del α -CE no está del todo confirmada.

El α -CE y su producto de hidrólisis, el CT, provocan una transformación en las células embrionarias de hámster sirio (Kelsey y Pienta, 1981). Además los CEs (α -CE y β -CE) transforman los cultivos celulares de fibroblastos pulmonares V79 de hámster chino y de células embrionarias de ratón C3H-10T1/2 (Raaphorst *et al.*, 1987). Esta capacidad de mutación que presentan estos tres OE puede ser tomada como un indicio de la posible actividad carcinogénica de estos tres compuestos. Estos hechos están de acuerdo con la detección de CEs y CT en tejidos humanos donde la incidencia de cáncer es muy elevada. Así, se han aislado CEs y CT de fluidos de las glándulas mamarias (Gruenke *et al.*, 1987; Petrakis *et al.*, 1981) y CEs (α -CE: β -CE 1:10) de las secreciones de la prostáticas (Sporer *et al.*, 1982).

5.EFECTOS SOBRE MEMBRANA.

En las membranas plasmáticas, se incorpora tanto el colesterol biosintetizado endógenamente como el colesterol exógeno, compuesto esencial para el mantenimiento de la funcionalidad de la membrana. Por otro lado, se ha demostrado, *in vitro*, que los derivados oxidados del colesterol también se incorporan a la membrana plasmática, desplazando de ésta al colesterol y afectando de esta manera a su fluidez, estabilidad y permeabilidad (figura 3). Además, la incorporación de OE influye también a nivel de morfología, vida media y crecimiento celular. Otra posible fuente para los OE presentes en la membrana, además de su incorporación, es la de la oxidación del colesterol *in situ* mediante oxidantes extracelulares, de hecho en este caso el colesterol presentaría un efecto protector al actuar como antioxidante.

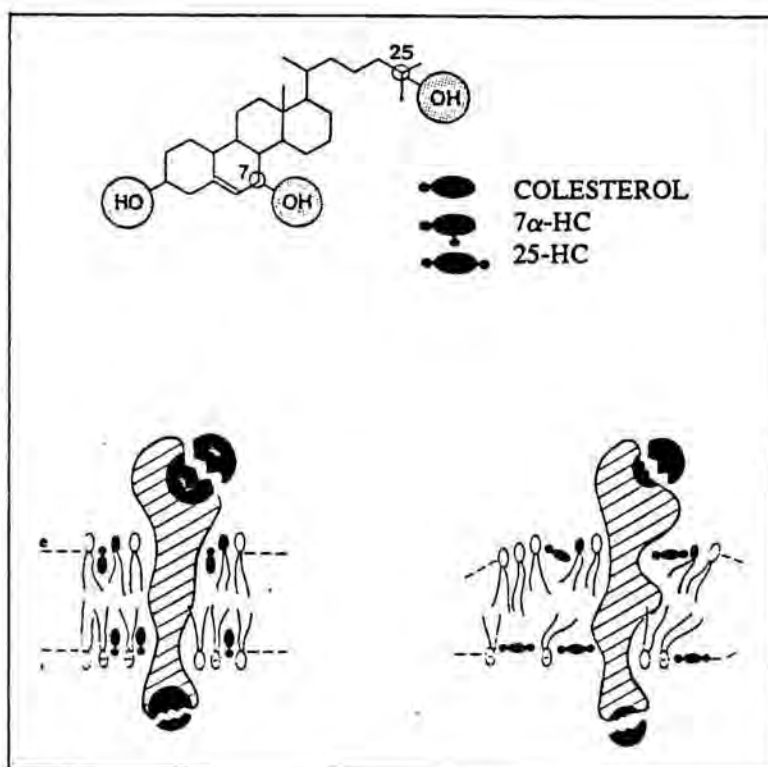


Figura 3-Esquema del efecto que ejerce la incorporación de oxisteroles en la membrana plasmática sobre su estructura (Crastes de Paulet et al., 1988).

Los OE al entrar a formar parte de las membranas afectan a su estructura proteica y fosfolipídica. La incorporación de 7α-HC en eritrocitos humanos produjo en un aumento de

su estructura helicoidal proteica (Smith y Johnson, 1989). Algunos OE afectan a la estereoquímica de las cadenas apolares de los FL. De hecho, en estudios realizados con liposomas se ha demostrado que los C-7 OE disminuyen la capacidad de empaquetamiento de las cadenas apolares de los FL (Benga *et al.*, 1983; Rooney *et al.* 1986). No obstante, se ha comprobado que otros OE (20-HC, 22S-HC, 25-HC y los epímeros del 23-HC) no poseen ningún efecto sobre la condensación de los FL (Benga *et al.*, 1983; Hagiwara *et al.*, 1982; Rooney *et al.*, 1986).

A nivel de permeabilidad, se ha comprobado que los OE influyen sobre la entrada de hexosas y sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. El CT afecta a la captación de hexosas, cosa que no hace el 25-HC, pero ambos afectan a la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. La razón de esta diferente forma de actuar parece ser que se encontraría en el hecho de que el CT actuaría entrando a formar parte de la membrana celular mientras que el 25-HC lo haría tan solo inhibiendo la biosíntesis de colesterol (Hill, 1984; Hill *et al.* 1983, 1984; Peng y Morin, 1987; Peng *et al.* 1985a).

Otro de los efectos de los OE a nivel de permeabilidad es su capacidad para modular el flujo de Ca^{++} a través de la membrana celular. Se sabe que la relación colesterol/fosfolípidos presente en la membrana influye sobre el flujo de Ca^{++} a través de la membrana, así una relación superior a 1.4 incrementa la entrada de Ca^{++} , mientras que una relación inferior a 0.75 causa una disminución en esta entrada. De esta forma, es lógico que los OE también afecten a este nivel. En los eritrocitos humanos la entrada de Ca^{++} viene favorecida por CT, 22S-HC y 26-HC e inhibida por 7 β -HC, 7-CC, 25-HC y 20-HC (Neyses *et al.*, 1984, 1985; Stimpel *et al.*, 1985). No obstante, en hepatocitos y plaquetas de rata 7-CC, CT y 26-HC estimula la entrada de Ca^{++} , mientras que la salida viene favorecida por la presencia de CEs (Sevanian y Peterson, 1986; Holmes *et al.*, 1986). El mecanismo de acción por el cual se produce este efecto parece ser debido a que la variación en la fluidez de la membrana, producida por la incorporación de OE en ella, también afecta a los canales del Ca^{++} .

Ensayos con liposomas han hecho pensar que la incorporación de OE a la membrana afecta al potencial de membrana para la conductividad de iones inorgánicos a través de ella (Krull *et al.*, 1985).

A nivel morfológico, mediante microscopía electrónica, se han observado cambios producidos por el 7 β -HC en preparaciones de plaquetas y eritrocitos bovinos (Saito *et al.*, 1985; Streuli *et al.* 1981) y producidos por el 25-HC en células de glioma humano (Maltese *et al.*, 1981).

6. INHIBICIÓN SOBRE LA HMG-CoA REDUCTASA Y EFECTOS SOBRE OTRAS ENZIMAS.

Los OE no tan solo poseen efecto sobre la actividad de la HMG-CoA reductasa, sino que también afectan a otras enzimas que intervienen en el metabolismo del colesterol como son: acetoacetil coenzima A tiolasa, acil CoA O-acetiltransferasa (ACAT), el sistema enzimático de ruptura de la cadena lateral del colesterol, colesterol 7 α -hidroxilasa, colesterol 5,6-epoxihidrolasa, HMG-CoA sintasa, metil esterol oxidasas y mevalonato Kinasa. En función de la enzima y de los OE implicados, estos últimos manifiestan efecto inhibitorio o bien activador.

6.1. EFECTO SOBRE LA HMG-CoA REDUCTASA.

La HMG-CoA reductasa, como es sabido, regula la etapa limitante en la síntesis de colesterol. Esta enzima es una glicoproteína transmembranosa, situada en el retículo endoplásmico, que transforma el 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A en mevalonato. Esta enzima viene regulado vía fosforilación (la forma fosforilada de la enzima es la inactiva y la no fosforilada la activa) y por el efecto retroactivo del propio colesterol.

Varios estudios realizados con diferentes tipos de células han demostrado que, cuando los períodos de incubación son cortos (4-6 hr), el colesterol libre, sin oxidar ni unir a lipoproteína, no presenta ningún efecto sobre la HMG-CoA reductasa. No obstante, también ha sido constatado por multitud de autores que un aumento del colesterol de la dieta provoca una disminución de la actividad de la HMG-CoA reductasa, a nivel hepático. Además, los trabajos en los que el colesterol libre presenta actividad sobre la HMG-CoA reductasa presentan períodos de incubación largos, con lo cual el colesterol puede oxidarse durante la incubación. Esto estaría de acuerdo con el hecho ampliamente comprobado de que una serie de OE presentan un efecto inhibitorio sobre la HMG-CoA reductasa.

Este efecto está en función de la estructura del OE. Así, la mayoría de los OE que presentan esta actividad se caracterizan por presentar un grupo hidroxilo libre en la posición 3 (Kandutsch y Chen, 1973), tanto es así, que al formarse los 3 β -ésteres de algunos de estos compuestos disminuye su actividad (Kandutsch y Shown, 1981; Parish *et al.*, 1979). A pesar de ello, existe algún compuesto con el núcleo del colestano que no presenta hidroxilo en el C-3 (5 α -colest-8(14)-en-15-ona) y si es capaz de inhibir la HMG-CoA reductasa (Miller *et al.*, 1987). Los derivados oxidados del colesterol presentan, además del hidroxilo en C-3, una segunda función oxigenada. En relación con la estructura y de forma genérica, cuanto más lejos se sitúe esta segunda función oxigenada del hidroxilo de C-3, mayor es la potencia del derivado. Por ello, los derivados más potentes son los que presentan esta segunda función en el anillo D o en la cadena lateral, como es el caso del 25-HC, uno de los OE más potentes. No obstante, también los numerosos derivados que se forman sobre el anillo B presentan capacidad para inhibir a la enzima (Brown y Goldstein, 1974; Chen *et al.*, 1974; Kandutsch y Chen, 1973). También referente a la relación estructura-actividad, en estos compuestos se ha observado que la entrada de una tercera función oxigenada sobre el colesterol no implica un aumento de la capacidad inhibidora. Así, el 5 α -colest-3 β ,5,6 β -triol y el 5 α -colest-3 β ,17 α ,20 α -triol poseen menor capacidad inhibitoria que los correspondientes 3 β ,6 β - y 3 β ,20-dioles (Kandutsch y Chen, 1974, 1978).

Últimamente, a nivel farmacológico se están desarrollando diferentes derivados oxidados del colesterol con el fin de obtener un fármaco efectivo para el control de los niveles plasmáticos del colesterol. La investigación se centra en compuestos con la segunda función oxigenada en el anillo D o en la cadena lateral. Este es el caso del 3 β -hidroxi-5 α -colest-8(14)-en-15-ona que es un potente inhibidor *in vitro*, que también ha manifestado su actividad *in vivo* en ratas y diferentes especies de monos. Este compuesto también inhibe la acetoacetil coenzima A tiolasa citosólica y la HMG-CoA sintasa (Smith y Johnson, 1989). También, se obtienen sintéticamente derivados con la segunda función oxigenada en la cadena lateral. De estos derivados el 25-fluoro-(22S)-colest-5-en-3 β ,22-diol y el 25-metil-(22S)-colest-5-en-3 β ,22-diol presentan actividad inhibidora *in vitro* e *in vivo* (Smith y Johnson, 1989).

Recientemente, se ha comprobado un efecto sinérgico entre 3 β -hidroxi-5 α -colest 8(14)-en-15-ona y (25R)-26-hidroxicolesterol para la inhibición de la HMG-CoA reductasa en células (Pinkerton *et al.*, 1992).

6.1.1.MECANISMO DE ACCIÓN.

El mecanismo de acción por el cual los OE inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa es un tema controvertido, debido a que se han postulado múltiples mecanismos de acción (figura 4), los cuales parece ser que contribuyen en mayor o menor grado a la inhibición de la enzima, en función del tipo de célula y del OE en cuestión. No obstante, existe un punto en el que están de acuerdo los diferentes investigadores, que es la necesidad de que se mantenga la integridad de la membrana plasmática para que se manifieste el efecto inhibitorio de estos compuestos, pues, se ha observado que la enzima aislado no responde a los OE (Smith y Johnson, 1989). Los diferentes mecanismos implicados en esta inhibición son:

- inhibición de la síntesis de la enzima;
- degradación de la enzima;
- modificación de la enzima;
- unión de los oxisteroles a proteínas citosólicas.

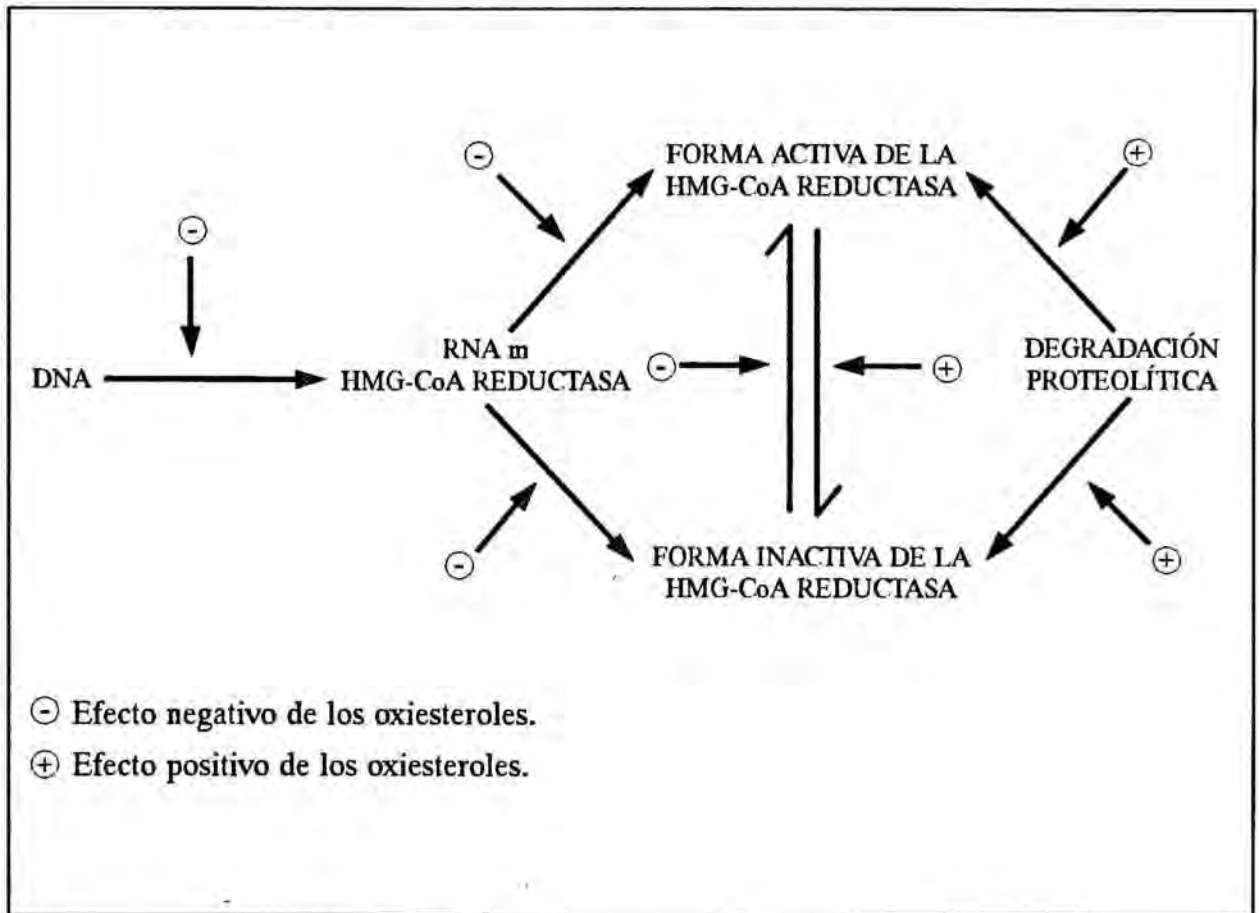


Figura 4- Posibles mecanismos de acción de los oxisteroles en la inhibición de la HMG-CoA reductasa.

Diferentes estudios han demostrado de una forma clara que, para que los OE manifiesten su efecto inhibitorio, es necesario que sea factible la síntesis proteica; no obstante, no está claro si esta síntesis desemboca en un aumento de la proteólisis y/o en una disminución de la síntesis de HMG-CoA reductasa (Smith y Johnson, 1989).

6.1.1.1. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA ENZIMA.

Se ha demostrado que la inhibición por lipoproteínas de la HMG-CoA reductasa se produce mediante una disminución en la síntesis de la enzima (Bell *et al.* 1976; Brown *et al.*, 1974; Brown y Goldstein, 1974, Sinensky *et al.*, 1979). En relación con este hecho, la observación de que células mutantes resistentes a la inhibición de la HMG-CoA reductasa producida por el 25-HC, también lo fueran a la acción de las lipoproteínas, hace pensar en un mecanismo de acción, para el 25-HC, parecido al de las lipoproteínas (Chen *et al.*, 1979; Sinensky *et al.*, 1979; Chang y Limanek, 1980). Una posible explicación para esta observación es que las lipoproteínas contengan el oxisterol, lo cual está de acuerdo con la capacidad de las lipoproteínas para unirse a los OE (Addis *et al.*, 1989; Brooks *et al.*, 1983, 1985; Emmanuel *et al.*, 1991; Smith y Johnson, 1989; Streuli *et al.*, 1981; Peng *et al.*, 1987) y también con la posible oxidación del colesterol unido a lipoproteínas (Smith y Johnson, 1989).

En relación con este punto, Tanaka *et al.* (1983) llegaron a la conclusión de que, en mieloblastos de pollo, la inhibición de la HMG-CoA reductasa se producía como consecuencia de un decremento del 72% en su síntesis y de un incremento del 350% en su degradación. Estas modificaciones en la síntesis y degradación de la enzima se producen de una forma relativamente rápida, 15-30 minutos después de la adición de 25-HC.

Por otro lado, algunos estudios proponen que los OE actúan a nivel transcripcional y traslacional sobre el RNAm de la HMG-CoA reductasa, inhibiendo así la síntesis de la enzima (Smith y Johnson, 1989; Tanaka *et al.*, 1983; Taylor, 1992). En este sentido, Chen *et al.*, en 1982, comprobaron que el tratamiento con inhibidores de la síntesis de RNA, como la actinomicina D o cordicepina, en células de ovario de hámster chino no afectaba a la capacidad inhibitoria del 25-HC sobre la HMG-CoA reductasa; no obstante, la preincubación de estas células con estos compuestos implicaba una disminución del poder inhibitorio del 25-

HC. En este mismo trabajo, se observó que la capacidad inhibidora del 25-HC disminuía cuando se añadía este compuesto junto a un inhibidor de la síntesis proteica (cicloheximida o puromicina). Además, esta capacidad desaparecía totalmente cuando las células eran preincubadas con uno de estos dos inhibidores.

En contraposición a todo esto, Brown y Goldstein (1974) observaron que el 7-CC era capaz de inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa pero no la síntesis total de proteína, medida en función de la incorporación de [³H]leucina en las proteínas precipitables con ácido acético. Existen otros trabajos en diferentes modelos celulares en los que no se relaciona la inhibición de la HMG-CoA reductasa con la inhibición de la síntesis proteica o de RNA (Kandustch y Chen, 1973).

6.1.1.2. DEGRADACIÓN DE LA ENZIMA.

Chang *et al.* (1981) demostraron que en células de ovario de hámster chino se producía un aumento en la vida media de la HMG-CoA reductasa al pasar de un medio rico en lípidos a un medio pobre en ellos, esto según estos autores era debido a una disminución en la degradación de la enzima. Además, en relación con la capacidad inhibidora de lipoproteínas y OE, existen algunos trabajos en los que se ha observado que la vida media de la HMG-CoA reductasa es diferente en función de que su inhibición venga producida por OE o lipoproteínas. (Bell *et al.*, 1976; Brown y Goldstein, 1974). Taylor (1992) comprobó que en células de ovario de hámster chino, diferentes OE activaban la degradación de la HMG-CoA reductasa y que, además, este efecto se correlacionaba con la capacidad de estos mismos OE para inhibir la HMG-CoA sintasa. No obstante, en células en las que se ha eliminado el núcleo con citocalasina B se ha demostrado que en presencia de cicloheximida, que es un inhibidor de la síntesis proteica, y 25-HC, la vida media de la HMG-CoA reductasa prácticamente no se ve alterada, con lo cual queda descartada del mecanismo de acción la degradación de la enzima a nivel citoplásmico (Cavenee *et al.*, 1981).



6.1.1.3. MODIFICACIÓN DE LA ENZIMA.

Beirne *et al.* (1977) observaron que el 25-HC en un cultivo de células de hepatoma inhibía en un 60% la actividad de la HMG-CoA reductasa, proporción similar a la de la forma inactiva de la enzima (50%). Esto fue lo que llevó a pensar a los autores que la disminución en la actividad de la enzima era debida a que éste sufría una modificación estructural. Las modificaciones estructurales propuestas son varias. La primera de ellas consistiría en un cambio estructural a nivel del centro activo de la enzima. La segunda sería una modificación mucho más profunda, que podría estar relacionada con una alteración de la síntesis de la enzima, en el sentido de que la presencia en el medio de cultivo, de manera prolongada, de 25-HC implicaría la formación de una forma inactiva de la enzima (Beirne *et al.*, 1977).

Probablemente, el mecanismo de acción más controvertido, de entre los propuestos, es el de la actuación de los OE a nivel de la fosforilación de la enzima. En la fosforilación de la HMG-CoA reductasa están implicados tres sistemas enzimáticos: un sistema bicíclico formado por la reductasa kinasa y la reductasa kinasa kinasa, la proteína kinasa C y la reductasa kinasa Ca^{++} /calmodulina dependiente. Al parecer, los OE intervendrían en la regulación del sistema bicíclico y de la formación del complejo Ca^{++} -calmodulina. La regulación de la formación de este complejo viene dada por la modulación que ejercen los OE sobre la entrada y salida de Ca^{++} a través de la membrana plasmática. No obstante existen trabajos en los que se demuestra que los OE no actúan a este nivel (Tanaka *et al.*, 1983). Así, Cavenee *et al.* (1981) concluyeron que los OE no influían en el sistema de fosforilación de la enzima, pues, observaron que en células sin núcleo el 25-HC no era capaz de inhibir la HMG-CoA reductasa ni de variar la relación entre la forma fosforilada y defosforilada de la enzima. El 25-HC, no obstante, manifiesta su actividad inhibidora sobre la HMG-CoA reductasa en multitud de células nucleadas, esto indica que en el mecanismo de inhibición estarían implicados procesos que se desarrollan en el núcleo.

6.1.1.4. UNIÓN DE LOS OXIESTEROLES A PROTEÍNAS CITOSÓLICAS.

Parece ser que la asociación entre los OE y proteínas citosólicas podría ser una de las etapas primarias en la regulación de la biosíntesis de colesterol. La formación de este complejo

proteína-OE ha sido observada por diferentes autores en varios modelos celulares. Se ha observado que estas proteínas poseen una elevadísima afinidad por los OE, la cual está correlacionada con su potencia inhibidora sobre la HMG-CoA reductasa (Kandutsch y Thompson, 1980; Sinensky y Mueller, 1981; Astruc *et al.*, 1985). Uno de los estudios más importantes en este campo es el de Taylor *et al.* (1984), en el que se estudió, para 47 OE, la correlación existente entre su unión a proteínas citosólicas y la inhibición de la HMG-CoA reductasa, obteniéndose una correlación muy positiva para 35 de estos derivados oxidados. No obstante, 12 de los OE mostraron una baja capacidad para unirse a proteínas citosólicas, en comparación con su poder inhibidor de la HMG-CoA reductasa. Esta unión proteína OE es un proceso saturable, específico y reversible (Gibbons, 1983; Smith y Johnson, 1989). Se podría pensar que estas proteínas son las mismas que reconocen y se unen a las hormonas esteroideas, pero no es así; sino que son proteínas con elevada afinidad por los OE y muy baja para el colesterol. Patel y Thompson (1990) consiguieron aislar y caracterizar una de estas proteínas en células hepáticas humanas. La unión de esta proteína a los OE fue inhibida competitivamente por otros OE, pero no por el colesterol ni por las hormonas esteroideas. En relación con este punto, cabe citar que una unión similar se produce entre las proteínas citosólicas de diferentes células (linfocitos humanos y fibroblastos de embriones de rata) y los OE que inhiben la síntesis de DNA (Smith y Johnson, 1989).

6.1.2.EFECTO SOBRE OTRAS ENZIMAS.

Como ya hemos comentado, los OE, además de inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa, también afectan a otros enzimas que intervienen en el metabolismo del colesterol.

Acil CoA O-acetiltransferasa (ACAT): se ha comprobado en un total de más de 20 trabajos recogidos por Smith y Johnson (1989) que el 7-CC y el 25-HC son capaces de estimular la actividad de la ACAT en diferentes modelos celulares. No obstante, algunos OE como la 3 β -hidroxi-5 α -colest-8(14)-en-15-ona inhiben a esta enzima tanto *in vitro* como *in vivo* (Miller *et al.*, 1987; Needleman *et al.*, 1987).

Sistema enzimático de ruptura de la cadena lateral del colesterol: este sistema enzimático está situado en los tejidos esteroideogénicos a nivel mitocondrial formando parte del complejo

citocromo P-450. Para que el sistema actúe sobre el colesterol es indispensable la unión del sustrato al citocromo P-450. Este sistema actúa sobre el colesterol, a nivel de la biosíntesis de hormonas esteroideas, introduciendo en él dos grupos hidroxilos en las posiciones 20 y 22 y produciendo una rotura carbono-carbono que libera una fracción isohexil de su cadena lateral. Algunos OE 7α -HC, 7β -HC 20 -HC $22R$ -HC y 25 -HC son sustrato de este sistema enzimático e inhiben la actuación de la enzima sobre el colesterol (Heyl *et al.*, 1986; Kido *et al.*, 1981; Lambeth y Kriengsiri, 1985; Lambeth *et al.*, 1987; Tuckey y Kamin, 1982; Xu *et al.*, 1987). En relación con esta enzima y alrededor del 25 -HC existe una clara controversia, mientras se ha comprobado que este compuesto en las mitocondrias del tejido adrenal de ratas inhibe la formación de hormonas esteroideas, en las mitocondrias del tejido adrenal fetal estimula su formación. La explicación a esto es que en el segundo caso el 25 -HC es sustrato de la enzima y también da lugar a estas hormonas, mientras que en el primero actúa tan sólo como un inhibidor competitivo de la enzima.

Colesterol 7α -hidroxilasa: esta enzima, que interviene en la biosíntesis de ácidos biliares, está situado a nivel de microsomas hepáticos y es inhibido, *in vitro*, de forma competitiva por el 7α -HC, 7β -HC y 7 -CC. No obstante, Björkhem *et al.* (1987) observaron que, *in vivo*, altos niveles de 7α -HC eran compatibles con una elevada actividad de la enzima.

Colesterol-5,6-epóxido hidrolasa: Se ha comprobado, *in vitro*, que esta enzima está implicado en la transformación de CEs en CT (Danielsson y Horning, 1962; Sevanian y McLeod, 1986; Sevanian *et al.*, 1980; Watabe *et al.*, 1980). Esta enzima es inhibido por el 7 -CC, 6 -CC y por el propio CT (Smith y Johson, 1989).

Metil esterol oxidasas: estas enzimas son cruciales para el paso de lanosterol a colesterol y son inhibidos por diferentes OE. Tabacik *et al.*, en 1987, observaron que el 7β -HC y el 25 -HC presentan actividad inhibidora sobre estas enzimas en linfocitos de cobayas. Estas enzimas también son inhibidos por el CT y 25 -HC en microsomas hepáticos (Grinstead *et al.*, 1983).

7.RESÚMEN DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS OXIESTEROLES.

La **citotoxicidad** radica en la capacidad de los OE para incorporarse a las membranas celulares y para inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa.

- Citotoxicidad *in vitro*: se ha comprobado para un total de 28 derivados oxidados del colesterol en diferentes modelos celulares.
- Citotoxicidad *in vivo*: básicamente se ha observado para el 7 α -HC, 25-HC y CT sobre microorganismos; y para el 25-HC, 26-HC y CT tras su implantación subcutánea en animales.
- Actividad antitumoral: en diversos estudios *in vivo* se ha relacionado la actividad citotóxica de ciertos OE (7 β -HC, 25-HC y 7-CC) con su poder para inhibir el crecimiento de células tumorales.

En relación con la **aterogénesis** se han demostrado, *in vitro*, diferentes actividades de los Oe que pueden estar relacionadas con la capacidad aterogénica de estos compuestos. Las más estudiadas de estas actividades y los OE que las presentan son:

- efectos sobre la permeabilidad del endotelio vascular (CEs, 7-HCs, 25-HC, CT y 7-CC);
- inhibición sobre la síntesis de prostaciclina (PGI₂) y potenciación de la agregación plaquetaria (CT y 25-HC);
- citotoxicidad para las células musculares lisas vasculares (β -CE, 25-HC, 7-CC y CT);
- modificaciones de la funcionalidad del receptor LDL (CEs, 25-HC, CT, 7-CC y 26-HC).

Además de estas actividades *in vitro* la aterosclerosis se ha inducido experimentalmente en animales, demostrándose efecto aterogénico para varios OE: CEs, 25-HC, CT y 7-CC. Además, se han aislado algunos OE (CEs, 25-HC y 26-HC) en lesiones ateromatosas y sangre humana (α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 20-HC, 25-HC, 26-HC y 7-CC).

Mutagénesis y carcinogénesis. Se ha demostrado la mutagenicidad de determinados hidroperóxidos del colesterol (7α -HPC y 5α -HPC) y de los CEs sobre microorganismos. La actividad carcinogénica ha sido únicamente demostrada con certeza para el α -CE. Se ha comprobado la inhibición de la síntesis de DNA por parte de diferentes OE (7α -HC, 7β -HC, 7-CC, 22R-HC, 22S-HC, 24R-HC, 24S-HC, 25-HC y (25R)-26-HC).

Efectos sobre membrana. Los OE (7-HCs, CT y 7-CC) se incorporan a la membrana plasmática, desplazando de ésta al colesterol y afectando de esta manera a su fluidez, estabilidad y permeabilidad. Los OE inhibidores de la actividad de la HMG-CoA reductasa también provocan cambios en la membrana, pues, implican una disminución de la síntesis del colesterol que es un compuesto esencial para el mantenimiento de la funcionalidad de la membrana.

Inhibición sobre la HMG-CoA reductasa y efecto sobre otras enzimas. La inhibición de la HMG-CoA reductasa por parte de los OE ha sido ampliamente constatada. Hasta un total de más de 80 de estos derivados presentan este efecto. La controversia se presenta en el mecanismo de acción por el cual los OE inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa. En esta inhibición se han implicado los siguientes mecanismos:

- inhibición de la síntesis de la enzima;
- degradación de la enzima;
- modificación de la enzima a nivel estructural o de fosforilación;
- unión de los OE a proteínas citosólicas.

Los OE, además de inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa, también afectan a otras enzimas que intervienen en el metabolismo del colesterol. Las enzimas afectadas y los OE relacionados son los siguientes.

- Acil CoA O-acetiltransferasa. Se ha comprobado en un total de más de 20 trabajos que el 7-CC y el 25-HC son capaces de estimular la actividad de esta enzima.
- Sistema enzimático de ruptura de la cadena lateral. Es inhibido por 7α -HC, 7β -HC, 20-HC, 22R-HC y 25-HC.

- Colesterol 7 α -hidroxilasa. Es inhibida de forma competitiva por el 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC.
- Colesterol-5,6-epóxido hidrolasa. Es inhibida por CT, 7-CC y 6-CC.
- Metil esterol oxidasas. Son inhibidas por 7 β -HC, 25-HC y CT.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Addis, P.B., Emanuel, H.A., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1989). Capillary GC quantification of cholesterol oxidation products in plasma lipoproteins of fasted humans. *Free Radical Biol. Med.* **7**, 179-182.

Ansari, G.A.S., Walker, R.D., Smart, V.B. y Smith, L.L. (1982). Further investigations of mutagenic cholesterol preparations. *Food. Chem. Tox.* **20**, 35-41.

Astruc, M.E., Beseme, F., Defay, R. y Crastes de Paulet, A. (1985). Evidence for a hydroxysterol binding protein (OSBP) in different cell lines: characterization and biological implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 623a.

Baranowski, A., Adams, C.W.M., Bayliss High, O.B. y Bowyer, D.B. (1982). Connective tissue responses to oxysterols. *Atherosclerosis.* **41**, 255-266.

Bates, S.R., Jett, C.M., y Miller, J.E. (1983). Prevention of the hyperlipidemic serum or LDL-induced cellular cholesterol ester accumulation by 22-hydroxycholesterol and its analogue. *Biochim. Biophys. Acta* **753**, 281-293.

Beirne, O.R., Heller, R., y Watson, J.A. (1977). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in minimal deviation hepatoma 7288C. Immunological measurements in hepatoma tissue culture cell. *J. Biol. Chem.* **252**, 950-954.

Bell, J.J., Sargeant, T.E., y Watson, J.A. (1976). Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in hepatoma tissue culture cells by pure cholesterol and several cholesterol derivatives. Evidence supporting two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **251**, 1745-1758.

Benga, G., Hodárnau, A., Ionescu, M., Pop, V.I., Frangopol, P.T., Strujan, V., Holmes, R.P. y Kummerow, F.A. (1983). A comparison of the effects of cholesterol and 25-hydroxycholesterol on egg yolk lecithin liposomes: spin label studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **414**, 140-152.

Bernheimer, A.W., Robinson, W.G., Linder, R., Mullins, D., Yip, Y.K., Cooper, N.S., Seidman, I. y Uwajima, T. (1987). Toxicity of enzymically-oxidized low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 260-266.

- Bischoff, F. (1969). Carcinogenic effect of steroids. En *Advances in lipid research*. (R. Paoletti y D. Kritchevsky, Ed.), p. 165. Academic Press. New York.
- Björkhem, I., Reihner, E., Angelin, B., Ewerth, S., Åkerlund, J.E. y Einarsson, K. (1987). On the possible use of the serum level of 7-hydroxycholesterol as a marker for increased activity of the cholesterol 7 α -hydroxylase in humans. *J. Lipid. Res.* **28**, 889-894.
- Black, H.S. y Chan, J.T. (1976). Etiologic related studies of ultraviolet light-mediated carcinogenesis. *Oncology*. **33**, 119.
- Black, H.S. y Douglas D.R. (1972). Model system for the evaluation of the role of cholesterol α -oxide in ultraviolet carcinogenesis. *Cancer Res.* **32**, 2630-2632.
- Black, H.S. y Lo, W.B. (1971). Formation of a carcinogen in human skin irradiated with ultraviolet light. *Nature* **234**, 306-308.
- Blackburn, G.M., Rashid, A. y Thompson, M.H. (1979). Interaction of 5 α ,6 α -cholesterol oxide with DNA and other nucleophiles. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 421.
- Blankenship, J.W., Van Gent, C.M., Sandberg, L.B., Roos, P.J. y Scharffenberg, J.A. (1991). Oxysterol incorporation into rat aorta resulting in elastin compositional changes. *Lipids* **26**, 381-383.
- Boissonneault, G.A., Hennig, B. y Ouyang, C-M. (1991a). Oxysterols, cholesterol biosynthesis, and vascular endothelial cell monolayer barrier function. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **196**, 338-343.
- Boissonneault, G.A., Hennig, B., Wang, Y, Ouyang, C-M, Krahulik, K., Cunnup, L. y Oeltgen, P-R. (1991b). Effect of oxysterol-enriched low density lipoprotein on endothelial barrier function in culture. *Am. Nutr. Metab.* **35**, 226-232.
- Brooks, C.J.W., Cole, J.W., MacLachlan, J. y Lawrie, T.D.V. (1985). Some aspects of the analysis of minor oxygenated sterols in serum and in serum lipoprotein fractions. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **62**, 622a.
- Brooks, C.J.W., Mckenna, R.M., Cole, W.J., MacLachlan, J. y Lawrie. T.D.V. (1983). Profile analysis of oxygenated sterols in plasma and serum. *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 700-701.
- Brown, M.S., Dana, S.E. y Goldstein, J.L. (1974). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolaemia. *J. Biol. Chem.* **249**, 789-796.
- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1974). Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblast by 7-Ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* **249**, 7306-7314.

- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1975). Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblast. *Cell* **6**, 307-316.
- Cavenee, W.K., Chen, H.W. y Kandutsch, A.A. (1981). Regulation of cholesterol biosynthesis in enucleated cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 2675-2681.
- Chan, J.T. y Black, H.S. (1974). Skin carcinogenesis: Cholesterol-5 α ,6 α -epoxide hydase activity in mouse skin irradiated with ultraviolet light. *Science* **186**, 1216-1217.
- Chang, T-Y. y Limanek, J.S. (1980). Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in Chinese hamster ovary cell. *J. Biol. Chem.* **255**, 7787-7795.
- Chang, T-Y., Limanek, J.S. y Chang, C.C.Y. (1981). Evidence indicating that inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by low density lipoprotein or by 25-hydroxycholesterol requires mediator proteins(s) with rapid turnover rate. *J. Biol. Chem.* **256**, 6174-6180.
- Chen, H.W., Cavenee, W.K. y Kandutsch, A.A. (1979). Sterol synthesis in variant Chinese hamster lung cells selected for resistance to 25-hydroxy-cholesterol. Cross resistance to 7-ketocholesterol. 20 α -Hydroxycholesterol and serum. *J. Biol. Chem.* **254**, 715-720.
- Chen, H.W., Kandutsch, A.A. y Waymouth, C. (1974). Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature*. **251**, 419-421.
- Chen, H.W., Richards, B.A. y Kandutsch, A.A. (1982). Inhibition of protein synthesis blocks the response to 25-hydroxycholesterol by inhibiting degradation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **712**, 484-489.
- Christ, M., Ji, Y-H., Moog, C., Pannecoucke, X., Schmitt, G., Bischoff, P. y Luu, B. (1991). Antitumor activity of oxysterols. Effect of two water-soluble monophosphoric acid diesters of 7 β -hydroxycholesterol on mastocytoma P815 *in vivo*. *Anticancer Res.* **11**, 359-364.
- Danielson, H. y Horning, M.G. (1962). On the oxidation of cholesterol by blood *in vitro*. *Acta Chem. Scand.* **16**, 774-775.
- De Flora, S., Camoirano, A., Znacchi, P. y Bennicelli, C. (1984). Mutagenicity testing with TA97 and TA102 of 30 DNA-damaging compounds, negative with other *Salmonella* strains. *Mutation Res.* **134**, 159-165.
- Drevon, C.A. y Evensen, S.A. (1984). Demonstration of intact intracellular cholesterol esterification and normal low-density lipoprotein pathway in fibroblasts from a patient with lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **794**, 479-483.

- Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1991). Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.* **56**, 843-847.
- Fornas, E., Martinez-Sales, V., Camañas, A. y Baguena, J. (1984). Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in the rat. *Arch. Farmacol. Toxicol.* **10**, 175-182.
- Gibbons, G.F. (1983). Molecular control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the role of oxygenated sterols. En *3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase* (J.R Sabine, Ed.) p. 153-168. CRC pres Inc., Boca Ratón, Florida, EUA.
- Gilbert, J.D., Brooks, C.J.W. y Harland, W.A. (1972). Lipids of human atheroma. VII. Isolation of diesters of cholest-5-ene-3 β ,26-diol from extracts of advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Biochim. Biophys. Acta* **270**, 149-155.
- Glatt, H., Jung, R. y Oesch, F. (1983). Bacterial mutagenicity investigation of epoxides: drugs, drug metabolites, steroids and pesticides. *Mutation Res.* **111**, 99-118.
- Glomset, J.A., Geld, M.H. y Farnsworth, C.C. (1990). Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci* **15**, 139-142.
- Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1977). The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 897-930.
- Goldstein, J.L., Kita, T. y Brown, M.S. (1983). Defective lipoprotein receptor and atherosclerosis. *New Eng. J. Med.* **309**, 288-296.
- Gray, M.F., Lawrie, T.D.V. y Brooks, C.J.W. (1971). Isolation and identification of cholesterol α -oxide and other minor sterols in human serum. *Lipids* **6**, 836.
- Griminger, P. y Fisher, Hans. (1986). The effecte of dried and fresh eggs on plasma cholesterol and atherosclerosis in chickens. *Poult. Sci.* **65**, 979-982.
- Grinstead, G.F., Trzaskos, J.M., Billheimer, J.T. y Gaylor, J.L. (1983). Cytosolic modulators of activities of microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Effects of acil-CoA inhibition and cytosolic Z-protein. *Biochim. Biophys. Acta* **751**, 41-51.
- Gruenke, L.D., Graig, J.C., Petrakis, N.L. y Lyon, M.B. (1987). Analysis of cholesterol, cholesterol-5,6-epoxides and cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol in nipple aspirates of human breast fluid by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **14**, 335-338.
- Guyton, J.R., Black, B.L. y Seidel, C.L. (1990). Focal toxicity of oxysterols in vascular smooth muscle cell culture. *Am. J. Pathol.* **137**, 425-434

Hagiwara, H., Nagasaki, T., Inada, Y., Saito, Y., Yasuda, T., Kojima, H., Morisaki, M. y Ikekawa, N. (1982). The interaction of cholesterol analogues with phospholipid-the effect of length of side-chain and configuration of a hydroxyl group introduce in the side-chain. *Biochem. Int.* **5**, 329-336.

Harland, W.A., Smith, A.G. y Gilbert, J.D. (1973). Tissue reaction to atheroma lipids. *J. Pathol.* **111**, 247-253.

Herian, A.M., Kuehl, N.M. y Lee, K. (1985). Growth inhibition of *Mycoplasma gallisepticum* following membrane insertion of cholesterol autoxidation products. *J. Food Protection.* **48**, 1050-1053.

Heyl, B.L., Tyrrell, D.J. y Lambeth, J.D. (1986). Cytochrome P-450_{sc} substrate interactions. Role of the 3 β -and side chain hydroxyls in binding to oxidized an reduced of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **261**, 2743-2749.

Hietter, H., Bischoff, P., Beck, J.P., Ourisson, G. y Luu, B. (1986). Comparative effects of 7 β -hydroxycholesterol towards murine lymphomas, lymphoblasts and lymphocytes: selective cytotoxicity and blastogenesis inhibition. *Cancer Biochem. Biophys.* **9**, 75-83.

Higley, N.A., Beery, J.T., Taylor, S.L., Porter, J.W., Dziuba, J.A. y Lalich, J.J. (1986a). Comparative atherogenic effects of cholesterol and cholesterol oxides. *Atherosclerosis* **62**, 91-104.

Hill, J.C. (1984). Effects of cytotoxic cholesterol autoxidation derivatives on membrane function. *Diss. Abstr. Int. B.* **45**, 1158a.

Hill, J.C., Peng, S.K., Morin, R.J. y Taylor, C.B. (1984). Effects of cholesterol autoxidation derivatives on hexose transport in cultured aortic smooth muscle cells. *Exp. Molec. Pathol.* **41**, 249-257.

Hill, J.C., Peng, S.K., Safarik, J. y Taylor, C.B. (1983). Effects on hexose transport and cholesterol uptake by cholesterol oxidation products in cultured aortic smooth muscle cells. *Federation Proc.* **42**, 787a.

Holmes, R.P., Kou, I.L. y Yoss, N.L. (1986). The effect of 26-hydroxycholesterol on the permeability of membranes to Ca²⁺. *Federation Proc.* **45**, 310a.

Hu, B. Peng, S.K., Brubaker, D. y Morin, R.J. (1990). Influence of cholesterol oxides and antioxidants on prostacyclin production by cultured endothelial cells. *FASEB J.* **4**, 3734.

Hubbard, R.W., Ono, Y. y Sanchez, A. (1989). Atherogenic effect of oxidized products of cholesterol. *Prog. Food Nutr. Sci.* **13**, 17-44.

Hwang, P.L.H. (1992). Inhibitors of protein and RNAQ synthesis block the cytotoxic effects of oxygenated sterols. *Biochim. Biophys. Acta* **1136**, 5-11.

Imai, H. y Lee, K.T. (1983). Mosaicism in female hybrid hares heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. IV. Aortic atherosclerosis in hybrid hares fed alternating cholesterol-supplemented and nonsupplemented diets. *Exp. Molec. Pathol.* **39**, 11-23.

Imai, H. y Nakamura, H. (1980). Short-term responses to cholesterol and oxygenated derivatives. *Federation Proc.* **39**, 772a.

Imai, H., Werthessen, N.T., Subramanyam, V., LeQuesne, P.W., Soloway, A.H. y Kanisawa, M. (1980). Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. *Science* **207**, 651-653.

Imai, H., Werthessen, N.T., Taylor, C.B. y Lee, K.T. (1976). Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **100**, 565-572.

Jacobson, M.S. (1987). Cholesterol oxides in indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in indian immigrant populations. *Lancet Septiembre 19*, 656-658.

Jacobson, M.S., Nair, P.P., Naseem, S.M., Smith, T.D. y Heald, F.P. (1981). Oxygenated cholesterol: new risk factors for atherosclerosis?. *Pediatric Res.* **15**, 535a.

Jacobson, M.S., Price, M.G., Shamo, A.E. y Heald, F.P. (1985). Atherogenesis in white carneau pigeons: effects of low-level cholestane-triol feeding. *Atherosclerosis* **57**, 209-217.

Johnson, B.H. y Smith, L.L. (1983). Mutagens in human aortal lipids. *Federation Proc.* **42**, 2089a.

Johnson, B.H. y Smith, L.L. (1984). A search for mutagens in human aortal lipid extracts. *Atherosclerosis* **53**, 331-336.

Kadis, B. (1978). Steroid epoxides in biological systems: a review. *J. Steroid Biochem.* **9**, 75-81.

Kandutsch, A.A. y Chen, H.W. (1973). Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* **248**, 8408-8417.

Kandutsch, A.A. y Chen, H.W. (1974). Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain. *J. Biol. Chem.* **249**, 6057-6061.

Kandutsch, A.A. y Chen, H.W. (1978). Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols. *Lipids* **13**, 704-707.

Kandutsch, A.A. y Shown, E.P. (1981). Assay of oxysterol-binding protein in a mouse fibroblast, cell-free system. *J. Biol. Chem.* **256**, 13068-13073.

- Kandutsch, A.A. y Thompson, E.B. (1980). Cytosolic proteins that bind oxygenated sterols. Cellular distribution, specificity, and some properties. *J. Biol. Chem.* **255**, 10813-10826.
- Kelsey, M.I. y Pienta, R.J. (1979). Transformation of hamster embryo cells by cholesterol α -epoxide and lithocholic acid. *Cancer Lett.* **6**, 143-149.
- Kelsey, M.I. y Pienta, R.J. (1981). Transformation of hamster embryo cells by neutral sterols and bile acids. *Toxicol. Lett.* **9**, 177-182.
- Kido, T., Yamakura, F. y Kimura, T. (1981). The transfer of cholesterol and hydroxycholesterol derivatives from liposome to soluble cytochrome P-450_{sec}. *Biochim. Biophys. Acta* **666**, 370-381.
- Kosykh, V.A., Lankin, V., Podrez, E.A., Dmitry, K.N., Volgushev, S.A., Victorov, A.V., Repin, V.S. y Smirnov, V.N. (1989). Very low density lipoprotein secretion by cultured hepatocytes of rabbits receiving old commercial and purified cholesterol. *Lipids* **24**, 109-115.
- Krull, U.J., Thompson, M., Vandenberg, E.T. y Wong, H.E. (1985). Langmuir-Blodgett film characteristics and phospholipid membrane ion conduction. Part I. Modification by cholesterol and oxidized derivatives. *Anal. Chim. Acta* **174**, 83-94.
- Krut, L.H. (1982a). Solubility of cholesterol *in vitro* promoted by oxidation products of cholesterol. *Atherosclerosis* **43**, 95-104.
- Krut, L.H. (1982b). Clearance of subcutaneous implants of cholesterol in the rat promoted by oxidation products of cholesterol. *Atherosclerosis* **43**, 105-118.
- Kucuk, O., Stoner-Picking Yachnin, S., Gordon, L.I., Williams, R.M., Lis, J. y Westerman, M. P. (1992). Inhibition of NK cell-mediated cytotoxicity by oxysterols. *Cell. Immunol.* **139**, 541-549.
- Lambeth, J.D. y Kriengsiri, S. (1985). Cytochrome P-450_{sec}-adrenodoxin interactions. Ionic effects on binding, and regulation of cytochrome reduction by bound steroid substrates. *J. Biol. Chem.* **260**, 8810-8816.
- Lambeth, J.D., Xu, X.X. y Glover, M. (1987). Cholesterol sulfate inhibits adrenal mitochondrial cholesterol side chain cleavage at a site distinct from cytochrome P-450_{sec}. Evidence for an intramitochondrial cholesterol translocator. *J. Biol. Chem.* **262**, 9181-9188.
- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwierts, E.A. y Ames, B.N. (1982). A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7445-7449.
- Lorenzo, J.L., Allorio, M., Bernini, F., Corsini, A. y Fumagalli, R. (1987). Regulation of low density lipoprotein metabolism by 26-hydroxycholesterol in human fibroblasts. *FEBS Lett.* **218**, 77-80.

Luu, B. (1986). Use of in vitro cell cultures to study cytotoxic properties of natural products. En *Advances in medical phytochemistry* (D. Barton y W.D. Ollis, Ed.). p. 97-101 John Libbey, London.

Luu, B. y Moog, C. (1991). Oxysterols: Biological activities and physicochemical studies. *Biochimie* **73**, 1371-1320.

Maltese, W.A., Reitz, B.A. y Volpe, J.J. (1981). Selective decrease of the viability and the sterol content of proliferating versus quiescent glioma cells exposed to 25-hydroxycholesterol. *Cancer Res.* **41**, 3448-3452.

Martínez-Sales, V., Fornas, E. y Camañas, A. (1985). Prostacyclin production and lipid peroxidation in the aorta of rats fed with cholesterol oxidation products. *Artery* **12**, 213-219.

Matthias, D., Becker, C.H., Godicke, W., Schmidt, R. y Ponsold, K. (1987). Action of cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol on rats with particular reference to the aorta. *Atherosclerosis* **63**, 115-124.

Miller, L.R., Needleman, D.H., Brabson, J.S., Wang, K.S. y Schroepfer, G.J. (1987). 5 α -cholest-8(14)-en-3 β -ol-15-one. A competitive substrate for acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 934-940.

Missler, S.R., Wasilchuk, B.A. y Merritt, C. (1985). Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. *J. Food Sci.* **50**, 595-598, 646.

Mitchell, I.G. (1980). Forward mutation in *Escherichia coli* and gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* compared quantitatively with reversion in *Salmonella typhimurium*. *Agents & Actions* **10**, 287-295.

Moog, C., Hergueux, J., Italiano, L., Luu, B. y Bischoff, P. (1986). Inhibition of lymphocyte activation by 7,25-dihydroxy-cholesterol: a preliminary report. *IRCS Med. Sci.* **14**, 1207-1208.

Moog, C., Ji, Y.H., Waltzinger, C., Luu, B. y Bischoff, P. (1990). Studies on the immunological properties of oxysterols: *in vivo* actions of 7, 25-dihydroxycholesterol upon peritoneal cells. *Immunol* **70**, 344-350.

Morin, R. y Peng S.K. (1989). Effects of cholesterol oxidation derivatives on cholesterol esterifying and cholesteryl ester hidrolitic enzyme activity of cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Lipids* **24**, 217-220.

Naseem, S.M. y Heald, F.P. (1987). Cytotoxicity of cholesterol oxides and their effects on cholesterol metabolism in cultured human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Int.* **14**, 71-84.

Needleman, D.H., Strong, K.A., Stemke, K.A., Brabson, J.S., Kusic, A. y Schroepfer, G.J. (1987). Inhibitors of sterol synthesis. Effect of dietary 5 α -cholest-8(14)-en-3 β -ol-15-one on ACAT activity of jejunal microsomes of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 920-925.

Neyses, L., Locher, R., Stimpel, M., Streuli, R. y Vetter, W. (1985). Stereospecific modulation of the calcium channel in human erythrocytes by cholesterol and its oxidized derivatives. *Biochem. J.* **227**, 105-112.

Neyses, L., Stimpel, M., Locher, R., Kueffer, B. y Vetter, W. (1984). Cholesterol and its oxidized derivatives modulate the calcium channel in human red blood cells. *J. Hypertension* **2** (Suppl. 3), 489-492.

Nordman, P., Diez-Ibanez, M., Chessebeuf-Padieu, M., Luu, B., Mack, G. y Mersel, M. (1989). Toxic effects of 7 β -hydroxycholesterol on rat liver primary cultures, epithelial lines and co-cultures. *Cell Biol Toxicology* **5**, 261-270.

Oram, J.F., Brinton, E.A. y Bierman, E.L. (1981). Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **72**, 1611-1621.

Parish, E.J., Tsuda, M. y Schroepfer, G.J. (1979). Synthesis properties and reactions of 3 β -benzoyloxy-7 α -15 β -dichloro-5 α -cholest-8(14)-ene. *Chem. Phys. Lipids* **24**, 167-182.

Patel, N., T. y Thompdon, E., B. (1990). Human oxysterol-binding protein.I. Identification and characterization in liver. *J. Clin.* **71**, 1637-1644.

Peng, S.K., Hu, B., Brubaker, D., Marcus, C. y Morin, R.J. (1990). Cholesterol oxides enhance platelet adhesion to endothelial cells *in vitro*. *FASEB J.* **4**, 3733.

Peng, S.K., Hu, B. y Morin, R.J. (1991). Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J. Clin. Lab.* **5**, 144-152.

Peng, S.K. y Morin, R.J. (1987). Effects on membrane function by cholesterol oxidation derivatives in cultured aortic smooth muscle cells. *Artery* **14**, 85-99.

Peng, S.K., Morin, R.J., Phillips, G.A. y Xia, G.Z. (1986). Absorption and transport of cholesterol autoxidation derivatives in rabbits. *Federation Proc.* **45**, 230a.

Peng, S.K., Morin, R.J. y Sentovich, S. (1985a). The effect of cholesterol oxidation products on membrane function. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 634-635a.

Peng, S.K., Phillips, G.A., Xia, G.Z. y Morin, R.J. (1987). Transport of cholesterol autoxidation products in rabbit lipoproteins. *Atherosclerosis.* **64**, 1-6.

Peng, S.K., Taylor, C.B., Hill, J.C. y Morin, R.J. (1985b). Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis.* **54**, 121-133.

- Peng, S.K., Taylor, C.B., Hill, J.C. y Safarik, J. (1982a). effect of oxidized cholesterol on the aorta of rabbits: Scanning electron microscopic observations. *Proc. Electron Microsc. Soc. Am.*, 40th Ann. meeting 1982, 340-341.
- Peng, S.K., Taylor, C.B., Huang, W.Y., Hill, J.C. y Mikkelson, B. (1980). The distribution of 25-hydroxycholesterol in lipoproteins of squirrel monkeys and its roles in atherogenesis. *Federation. Proc.* **39**, 589a.
- Peng, S.K., Taylor, C.B., Mosbach, E.H., Huang, W.Y., Hill, J. y Mikkelson, B. (1982b). Distribution of 25-hydroxycholesterol in plasma lipoprotein and its role in atherogenesis. A study in squirrel monkeys. *Atherosclerosis.* **41**, 395-402.
- Peng, S.K., Taylor, C.B., Safarik, J., Hill, J. y Mikkelson, B. (1982c). Arteriosclerosis induced by 25-hydroxycholesterol in squirrel monkeys. *Federation Proc.* **41**, 452a.
- Peng, S.K., Taylor, C.B., Tham, P. y Mikkelson, B. (1977). Effect of oxidation derivatives of cholesterol on cultured aortic smooth muscle cells. *Am. J. Phatol.* **86**, 53-54a.
- Peng, S.K., Wu, A.Y., Colacicco, L.A., Mikkelson, B. y Taylor, C.B. (1983). Inhibition of prostaglandin synthesis by cholesterol oxidation products in cultured aortic smooth muscle cells. *Federation Proc.* **42**, 809a.
- Petrakis, N.L., Gruenke, L.D. y Craig, J.C. (1981). Cholesterol an cholesterol epoxides in nipple aspirates of human breast fluid. *Cancer Res.* **41**, 2563-2565.
- Pinkerton, F., D., Pelley, R., P. y Shroepfer, G., J., Jr. (1992). Synergistic action of two oxysterols in the lowering of HMG-CoA reductase activity in CHO-K1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 569-573.
- Prasad, C.R. y Subramanian, R. (1992). Qualitative and comparative studies of cholesterol oxides in commercial and home-made indian ghees. *Food Chem.* **45**, 71-73.
- Raaphorst, G.P., Azzam, E.I., Langlois, R. y Van Lier, J.E. (1987). Effect of cholesterol α and β epoxides on cell killing and transformation. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2369-2372.
- Rodríguez, R.J., Arunachalam, T.A., Parks, L.W. y Caspi, E. (1983). Growth of a sterol auxotroph derived from *Saccharomyces cerevisiae* on Chemically synthesized derivatives of cholesterol possessing side-chain modifications. *Lipids* **18**, 772-775.
- Rooney, M., Tamura-Lis, W., Lis, L., Yachnim, S., Kucuk, O. y Kauffman, J.W. (1986). The influence of oxygenated sterol compounds on dipalmitoylphosphatidylcholin bilayer structure and packing. *Chem. Phys. Lipids* **41**, 81-92.
- Rong, S., Bergmann, C., Luu, B., Beck, J.P. y Ourisson, G. (1985). Activité antitumorale in vivo de dérivés hydrosolubles de 7-hydroxycholestérols. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris.* **300** (ser. III), 89-94.

- Ross, R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis an update. *New Engl. J. Med.* **314**, 488-500.
- Ross, R. (1987). Platelet-derived growth factor. *Annu. Rev. Med.* **38**, 71-79.
- Rueff, J. y Halpern, M. (1985). Testing human lipoproteins for mutagenic activity in the *Salmonella*/microsome assay. *Lipid metabolism and its pathology* (Halpern, M., Ed.). p. 161-167. Plenum Press. New York, EUA.
- Ruiz-Rubio, M., Alejandre-Duran, E. y Pueyo, C. (1985). Oxidative mutagens specific for A-T base pairs induce forward mutations to L-arabinose resistance in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* **147**, 153-163.
- Saito, Y., Shimada, H., Imada, T., Kikuchi, T., Ikekawa, N. y Inada, Y. (1985). Lysis of platelets and erythrocytes by the incorporation of a unique oxygenated sterol:22R-hydroxycholesterol. *J. Membrane Biol.* **83**, 187-191.
- Schafer, W.R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim, S.H. y Rine, J. (1989). Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in RAS genes of yeast and humans. *Science* **245**, 379-385.
- Schechter, I., Fogelman A.M., Haberland, M.E., Seager, J., Hokom, M., Edwards, P.A. (1981). The metabolism of native and malondialdehyde-altered low density lipoproteins by human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.* **22**, 63-71.
- Sentovich, S., Morin, R.J. y Peng, S.K. (1985). Effects of cholesterol oxidation derivatives on endocytosis of rabbit vascular endothelium. *Federation Proc.* **44**, 1263a.
- Sevanian, A. y McLeod, L.L. (1986). Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **261**, 54-59.
- Sevanian, A. y Peterson, A.R. (1984). Cholesterol epoxide is a direct acting mutagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4198-4202.
- Sevanian, A. y Peterson, A.R. (1986). The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1103-1110.
- Sevanian, A., Stein, R.A. y Mead, J.F. (1980). Lipid epoxide hydrolase in rat lung preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **614**, 489-500.
- Sinensky, M., Duwe, G. y Pinkerton, F. (1979). Defective regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in a somatic cell mutant. *J. Biol. Chem.* **254**, 4482.
- Sinensky, M. y Mueller, G. (1981). Cytosolic 25-hydroxycholesterol binding activity of chinese hamster ovary cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **209**, 314-320.

- Smith, L.L. y Johnson, B.H. (1989). Biological activities of oxysterols. *Free Radical Biol. Med.* **7**, 285-332.
- Smith, L.L., Made Gowda, N.M. y Teng, J.I. (1987). Sterol hydroperoxide metabolism by salmonella typhimurium. *J. Steroid Biochem.* **26**, 259-264.
- Smith, L.L., Smart, V.B. y Ansari, G.A.S. (1979). Mutagenic cholesterol preparations. *Mutation Res.* **68**, 23-30.
- Smith, L.L., Smart, V.B. y Made Gowda, N.M. (1986). Mutagenic sterol hydroperoxides. *Mutation Res.* **161**, 39-48.
- Smith, L.L y Van Lier, J.E. (1970). Sterol metabolism IX. 26-hydroxycholesterol levels in the human aorta. *Atherosclerosis* **12**, 1-14.
- Sporer, A., Brill, D.R. y Schaffner, C.P. (1982). Epoxycholesterols in secretions and tissue of normal, benign, and cancerous human prostate glands. *Urology* **20**, 244-250.
- Stimpel, M., Neyses, L., Locher, R., Streuli, R. y Vetter, W. (1985). Variations of the membraneous cholesterol content alter the calcium influx through the calcium-specific entry channel in human erythrocytes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 634a.
- Streuli, R.A., Chung, J., Scanu, A.M. y Yachnin, S. (1981). Serum lipoproteins modulate oxygenated sterol insertion into human red cell membranes. *Science.* **212**, 1294-1296.
- Tabacik, C., Aliau, S. y Sainte-Marie, J. (1987). Regulation of cholesterol biosynthesis at a stage after the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase step in normal and leukemic (L2C) guinea pig lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 405-410.
- Tanaka, R.D., Edwards, P.A., Lan, S-F. y Fogelman, A.M. (1983). Regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase Activity in avian myeloblasts. *J. Biol. Chem.* **258**, 13331-13339.
- Tanaka, M., Nagashima, Y. y Taguchi, T. (1986). A Kinetic Study of the Non-enzymatic Browning Reaction Between Histamine and Glucose. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* **52**, 1271-1274.
- Taylor, F.R. (1992). Correlation among oxysterol potencies in the regulation of the degradation of the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaril COA reductase, the repression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl COA synthase and affinities for the oxysterol receptor. *Biochem. Biophys. Res.* **186**, 182-189.
- Taylor, C.B. y Peng, S.K. (1985). Cytotoxicity and atherogenicity of oxidized cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 633a.

II.D. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE OXIESTEROLES.

1. INTRODUCCIÓN.	89
2. EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA.	90
3. PURIFICACIÓN DE LOS OXIESTEROLES.	107
1. Saponificación.	107
2. Cromatografía en columna.	109
3. Cromatografía en capa fina preparativa.	110
4. SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS OXIESTEROLES.	111
1. La cromatografía de gases.	112
1. Separación.	112
2. Identificación.	115
3. Cuantificación.	115
2. Cromatografía líquida de alta eficacia.	118
1. Resolución.	119
2. Detección e identificación.	124
3. Cuantificación	126
5. CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	126
1. Iones característicos de los oxisteroles en forma de trimetilsilil éteres.	127
2. Iones característicos de los oxisteroles sin derivatizar.	133
3. Monitorización de iones seleccionados.	135
6. BIBLIOGRAFÍA.	135

1.INTRODUCCIÓN.

Los derivados oxidados del colesterol se conocen desde principios de siglo, pero su presencia en alimentos (Acker y Greve, 1963) y sus implicaciones toxicológicas (Bischoff, 1969) se detectaron por primera vez durante los años 60, momento en el cual se planteó la necesidad de analizar la presencia de estos compuestos, básicamente, en alimentos, modelos experimentales y arterias, sangre y suero humanos.

El análisis de estos compuestos presenta una serie de problemas que son básicamente los siguientes:

- los OE son compuestos con una gran similitud estructural lo que requiere una elevada resolución por parte del método analítico;
- estos derivados oxidados se presentan en cantidades muy pequeñas, lo cual implica que el método debe caracterizarse por presentar una elevada sensibilidad;
- los alimentos y muestras procedentes de seres vivos poseen fracciones lipídicas muy complejas, donde los OE se encuentran a nivel traza, lo cual hace necesaria una purificación exhaustiva de estos compuestos;
- los OE se forman fácilmente a partir del colesterol y, a la vez, algunos de ellos son altamente inestables, con lo cual hay que poner especial atención a la formación de artefactos durante la manipulación de las muestras y el procedimiento analítico.

Todos estos problemas hacen que el análisis de estos compuestos sea altamente controvertido y que exista un número muy elevado de metodologías para llevarlo a cabo. Esta situación de controversia lleva a cuestionar la validez de muchas de estas metodologías y a seguir trabajando en la mejora y validación de estos métodos analíticos.

La gran mayoría de los métodos de análisis de OE suelen presentar las siguientes etapas:

- extracción de la fracción lipídica;
- purificación de los OE presentes en esta fracción;

- separación, identificación y cuantificación cromatográfica de los OE;
- confirmación de la identificación por EM.

2. EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA.

Los OE compuestos minoritarios de la fracción lipídica de algunos alimentos se encuentran entre los componentes más polares de dicha fracción. Algunos autores han comprobado que la mezcla CLO/MET (2:1, v/v) (ver abreviaturas tabla 1) es la más efectiva para extraer, al mismo tiempo, grasa total y compuestos polares como el colesterol de ciertos alimentos, entre los que se encuentra el huevo (Hubbard *et al.*, 1977; Kaneda *et al.*, 1980). Por otro lado, para la extracción de lípidos totales en alimentos y muestras de origen biológico, uno de los procedimientos de extracción más extendidos es el de Folch *et al.* (1957), que consiste en agitar la muestra en la mezcla CLO/MET (2:1, v/v). Este es el procedimiento más comúnmente empleado para extraer la fracción lipídica y, a continuación, sobre ella realizar el análisis de OE (tabla 2). No obstante, algunos autores han preferido la homogeneización con otros disolventes tales como, acetona, acetonitrilo (Kou y Holmes, 1985), cloroformo, hexano/isopropanol (3:2 ó 1:2, v/v), etanol/diclorometano (1:1, v/v) y éter metilterbutílico. En algunos trabajos a las mezclas de disolventes se les añade una pequeña proporción de antioxidante (tabla 2).

Tabla 1-Abreviaturas utilizadas en este capítulo.

aa	Aminoácidos	20-HC	20-HidroxiColesterol
ACE	Acetonitrilo	20 α -HC	20 α -HidroxiColesterol
BUT	Butanol	20S-HC	(20S)-20-HidroxiColesterol
CB	Cloruro de Benzoilo	22S-HC	(22S)-22-HidroxiColesterol
CC	Columna Capilar	23R-HC	(23R)-23-HidroxiColesterol
CCF	Cromatografía en Capa Fina	24R-HC	(24R)-24-HidroxiColesterol
7-CC	7-CetoColesterol	24S-HC	(24S)-24-HidroxiColesterol
22-CC	22-CetoColesterol	25-HC	25-HidroxiColesterol
6-CCL	6-CetoCoLestanol	(25R)-26-HC	(25R)-26-HidroxiColesterol
7-CCL	7-CetoCoLestanol	26R-HC	(26R)-26-HidroxiColesterol
22-CCL	22-CetoCoLestanol	26S-HC	(26S)-26-HidroxiColesterol
CE	Colesterol-5,6-Epóxido	HEX	Hexano
CEs	Colesterol-5,6-Epóxidos	7 α -HPC	7 α -HidroPeroxíColesterol
α -CE	Colesterol-5 α ,6 α -Epóxido	7 β -HPC	7 β -HidroPeroxíColesterol
β -CE	Colesterol-5 β ,6 β -Epóxido	7 α -HS	7 α -HidroxiSitosterol
5 α -CL	5 α -CoLestano	7 β -HS	7 β -HidroxiSitosterol
CG	Cromatografía de Gases	IR	Espectroscopía Infrarroja
CG-EM	Cromatografía de gases- Espectrometría de Masas	ISO	Isopropanol
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	LD	Límite de Detección
CLO	Cloroformo	LC	Límite de Cuantificación
CoC	CoCromatografía	MET	Metanol
CR	Columna de Relleno	ND	No Detectado
CT	ColestanTriol	NS	No Significativo(a)
DIL	Detector de Ionización de Llama	OE	OxiEsterol(es)
EM	Espectrometría de Masas	PI	Patrón Interno
FL	FosfoLípidos	RMN	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
FM	Fase Móvil	α -SE	Sitosterol-5 α ,6 α -Epóxido
FRR	Factor(es) de Respuesta Relativo(s)	β -SE	Sitosterol-5 β ,6 β -Epóxido
GT	Grasa Total	TEAP	TriEtilAminohidroxiPropil
4 β -HC	4 β -HidroxiColesterol	TMS	Derivatización en forma de TriMetilSilil éteres
7-HC	7-HidroxiColesterol	TG	TriGlicéridos
7-HCs	7-HidroxiColesterolos	TR	Tiempo de Retención
7 α -HC	7 α -HidroxiColesterol	UV	Espectrometría Ultravioleta
7 β -HC	7 β -HidroxiColesterol	*	Marca inicio programa de temperatura de horno
19-HC	19-HidroxiColesterol		



FARMAC

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Muestra	Patrones de oxisteroles	Extracción	Saponificación
Addis <i>et al.</i> , 1989.	Lipoproteínas obtenidas de plasma humano.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 7-CC y 5α -CL ^a .	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH metanólica 1N (en frío).
Bascoul <i>et al.</i> , 1986.	Sebos calentados.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20α -HC, colest-3,5-dien-7-ona y colestenona ^a .	—	KOH metanólica 1N (en caliente).
Cleveland y Harris, 1987.	Leche: completa (pasteurizada, UHT y evaporada) y desnatada (líquida y en polvo).	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20α -HC, colest-4-en-3-ona y colest-4,6-dien-3-ona.	HEX/ISO (1:2, v/v).	—
Csallany <i>et al.</i> , 1989.	carne de cerdo e hígado de rata: frescos, conservados diferentes períodos bajo diferentes condiciones e irradiados.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC y 7-CC. Método de cuantificación: patrón externo.	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Csiky, 1982.	Mantequilla sometida o no a calentamiento.	7α -HC, 7β -HC, 25-HC, 7-CC, 20α -HC, 4β -HC. Método de cuantificación: patrón externo.	—	—
De Vore, 1988.	Estudio de almacenamiento de hamburguesas frescas y cocidas con microondas.	7-CC. Método de cuantificación: patrón externo.	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Emanuel <i>et al.</i> , 1991.	Plasma y quilomicrones plasmáticos.	α -CE, β -CE, 7β -HC, 7-CC y 5α -CL ^a .	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH metanólica 1N (en frío).
Fillion <i>et al.</i> , 1991.	Patrones por separado y como mezclas.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT y 7-CC. Método de cuantificación: patrón externo.	—	—

^a Patrón interno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Purificación	Identificación	Cuantificación	Oxisteroles detectados en las muestras
Addis <i>et al.</i> , 1989.	—	CG: TR y CoC. CG-EM.	Derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 180°C → 210°C a 3°C/min).	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 7-CC.
Bascoul <i>et al.</i> 1986.	—	CCF con gel de sílice: Rf. CG: TR. CG-EM.	Comparación de 2 métodos: -CCF-DIL con gel de sílice; -CG con CC SE-54 a 274°C con derivatización de los OE con grupo C=O en forma de metiloxima y en forma de TMS para los que tienen grupo -OH.	Cuantificados: 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC. Observación: se da separación de los patrones ensayados.
Cleveland y Harris, 1987.	CCF preparativa con gel de sílice.	CCF con gel de sílice: Rf. CG-EM (70 ev).	—	Identificado: 7-HC (posiblemente 7 β -HC).
Csallany, 1989.	—	CLAE: TR y CoC. CG-EM (23 ev).	CLAE con columna de μ -Porasil: -FM, HEX/ISO (93:7, v/v) para determinar 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC y HEX/ISO (97:3, v/v) para determinar 25-HC; -detector, UV (233 nm para 7-CC y 206 nm para el resto de OE).	Cuantificados: 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC. Observaciones: método no válido para determinar α -CE y β -CE ya que no absorben al UV, se dan la linealidad, recuperaciones, LC y los espectros UV de los patrones de OE.
Csiky, 1982.	CLAE preparativa con columna Nucleosil NO ₂ : -FM, HEX; -detector, UV (210 nm).	CLAE: TR y CoC.	CLAE con columna de Nucleosil NO ₂ : -FM, BUT en HEX gradiente lineal (0-10%); -detector, UV (206 nm).	Cuantificados: 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, 7-CC y 4 β -HC. Observación: método no válido para determinar 20 α -HC.
De Vore, 1988.	Minicolumna de gel de sílice.	CLAE: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	CLAE con columna de gel de sílice: -FM, HEX/ISO (93:7, v/v); -detector, UV (233 nm).	Cuantificado: 7-CC. Observación: se da recuperación del método.
Emanuel <i>et al.</i> 1991.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	Derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 180°C → 210°C a 3°C/min).	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7 β -HC y 7-CC.
Fillion <i>et al.</i> , 1991.	—	Se dan TR y K'.	Derivatización (benzoiación) con CB. CLAE fase reversa con columna de Novapak C ₁₈ : -FM, ISO/agua (85:15, v/v); -detector, UV (230 nm). La derivatización implica un aumento de absorción a 230 nm con lo cual aumenta la sensibilidad del método y se pueden detectar todos los OE a la misma longitud de onda (230 nm).	Se calcula la linealidad y el LD del método para: CE (α -CE + β -CE), 7-HC (7 α -HC + 7 β -HC), 25-HC, CT y 7-CC. Este método no separa los isómeros del colesterol-5,6-epóxido y del 7-hidroxicoolesterol.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Muestra	Patrones de oxisteroles	Extracción	Saponificación
Finocchiaro <i>et al.</i> , 1984.	Quesos y mantequilla fundida clarificada (recién elaborada y almacenada bajo diferentes condiciones).	α -CE, 7α -HC, 7β -HC y CT. Método de cuantificación: patrón externo.	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH etanólica 1.5N (en caliente).
Fontana <i>et al.</i> , 1992.	Yema de huevo en polvo obtenida por atomización.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20-HC éster metílico del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ^a .	En columna de gel de sílice. Elución con fracciones de polaridad creciente.	—
Herian y Lee, 1985.	Estudio de irradiación de huevo en polvo con luz fluorescente.	7α -HC y 7β -HC. Método de cuantificación: patrón externo.	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH etanólica 1.5N (en caliente).
Higley <i>et al.</i> , 1986.	Carnes y productos cárnicos: frescos y cocidos.	7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20α -HC, 19-HC, 22S-HC, 22-CC y 6-CC.	En columna de Celita 545 + $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Elución con cloruro de metileno/MET (9:1, v/v).	KOH metanólica 0.5N (en caliente).
Hwang y Maerker, 1993.	Estudio de conservación de carnes de buey, ternera y cerdo (irradiadas o no con rayos gamma).	Grupo 1: α -CE, β -CE, 7-CC y 7-CCL ^a , Grupo 2: colest-4-en-3-ona, colest-4-en-3,6-diona, colest-4,6-dien-3-ona y colest-5,24-dien-3 β -ol ^a (desmosterol).	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Ibrahim <i>et al.</i> , 1990.	Mezcla de carne de cerdo con un subproducto procedente de la extracción de aceite de soja (calentada a varias temperaturas durante períodos de tiempo de diferente duración).	CE (no especifica cual de los dos isómeros), 7β -HC, CT, 25-HC, 7-CC y 5α -CL ^a .	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH metanólica 2N (en frío).
Jacobson, 1987.	Mantequilla y mantequilla clarificada (ghee) recién elaboradas.	CE (no especifica cual de los dos isómeros), 7α -HC, 7β -HC, CT, 25-HC y 20α -HC.	—	KOH 15% (en caliente y en atmósfera de nitrógeno).

^a Patrón interno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Purificación	Identificación	Cuantificación	Oxisteroles detectados en las muestras
Finocchiaro <i>et al.</i> , 1984.	CCF preparativa con gel de sílice.	CCF con gel de sílice: Rf. CLAE: TR. EM con los OE purificados procedentes de CLAE.	Dos métodos de cuantificación: CCF con gel de sílice. CLAE fase reversa con columna μ -Bondapak C ₁₈ : -FM, ACE/agua (9:1, v/v); -detector, UV (212 nm) para 7-HCs y refractómetro para CT, α -CE y β -CE.	Cuantificados: CE _s , 7 α -HC, 7 β -HC y CT. Observación: el método separa los CE _s pero se dan juntos ya que sólo se dispone de patrón de α -CE
Fontana, <i>et al.</i> , 1992.	1 ^o CLAE preparativa con columna de μ -Porasil: -FM, HEX/ISO (94:6, v/v); -detector, UV (208, 235 y 256 nm simultáneamente). 2 ^a CLAE preparativa con columna de C ₁₈ : -FM, agua en MET gradiente (5-15%); -detector, UV y refractómetro.	CCF con gel de sílice: Rf. CLAE: TR y CoC. ¹ H-RMN.	¹ H-RMN 500 MHz.	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC. Observaciones: se dan linealidad y recuperaciones calculadas adicionando patrones a yema de huevo en polvo obtenida por liofilización.
Herian y Lee, 1985.	1 ^o columna de gel de sílice. 2 ^o columna de Florisil-AgNO ₃ .	CCF con gel de sílice: Rf.	CLAE con columna de LiChrosorb Si 60: -FM, HEX/ISO (100:3, v/v y 11:1, v/v); -detector, refractómetro.	Cuantificados: 7 α -HC y 7 β -HC. Observación: inyectados a igual concentración dan picos con áreas iguales.
Higley <i>et al.</i> , 1986.	1 ^o columna de gel de sílice. 2 ^o columna de Florisil-AgNO ₃ . 3 ^o cartucho de gel de sílice (Sep-Pak) se recogen 2 eluatos: A y B. B contiene el CT y A el resto de OE.	CCF con gel de sílice: Rf. CLAE: TR.	CLAE con columna de Accupak Si del eluato A: -FM, HEX/ISO (96:4, v/v); -detector, UV (212 nm). CLAE fase reversa con columna de microsorb C ₁₈ del eluato B: -FM, ACE/agua (9:1, v/v). -detector, UV (240 nm).	Cuantificados: 7 α -HC, 7 β -HC, CT, 19-HC, 22-CC y 6-CC.
Hwang y Maerker, 1993.	1 ^o minicolumna de gel de sílice. 2 ^o minicolumna de gel de sílice. 3 ^o CCF con gel de sílice. con estas tres fases se separan los compuestos del grupo 1 y del 2.	CCF con gel de sílice: Rf. CG: TR.	Sin derivatización. CG (introducción de la muestra en cabeza de columna) con CC DB-5 (3 min a 100 °C, de 100 °C \rightarrow 260 °C a 30 °C/min, de 260 °C \rightarrow 277 °C a 0.6 °C/min y de 277 °C \rightarrow 310 °C a 30 °C).	Cuantificados: todos los patrones de OE. Observaciones: se dan recuperaciones y LD.
Ibrahim <i>et al.</i> , 1990.	Columna de alúmina.	CG: TR y CoC. CG-EM	CG con CC DB-1 (de 100 °C \rightarrow 265 °C a 5 °C/min).	No identificado ninguno de los patrones en las muestras. Se da recuperación de los patrones.
Jacobson, 1987.	—	CCF con gel de sílice: Rf. CLAE fase reversa con columna Varian micropak MCH10 C ₁₈ : -FM, MET; -detector, no especificado.	CCF-densitometría con gel de sílice.	Cuantificados: todos los patrones de OE.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Muestra	Patrones de oxisteroles	Extracción	Saponificación
Korahani <i>et al.</i> , 1981.	Patrones por separado y como mezclas y colesterol autooxidado por calefacción.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20S-HC, 22S-HC, 23R-HC, 24R-HC, 24S-HC, (25R)-26-HC, 5α -CL, colest-3,5-dien-7-ona, 5α -colest-3 β -ol, 5α -colest-3-ona, colest-4-en-3-ona, colest-5-en-3 β ,22,23-triol, 5α -colest-7-en-3 β -ol, colest-5,7-dien-3 β -ol y colest-5,24-dien-3 β -ol (desmosterol).	—	—
Lee <i>et al.</i> , 1985.	Estudio de almacenamiento de patatas fritas y chips.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, α -SE, 7α -HS y 7β -HS. Método de cuantificación: patrón externo.	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH etanólica 1.5N (en caliente).
Luby <i>et al.</i> , 1986.	Estudio de irradiación de la mantequilla con luz fluorescente.	α -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 4 β -HC, colest-3 β , 5α -diol-6-ona, 5α -colest-3 β -ol-6-ona, 5α -colest-3,6-diona, colest-4-en-3-ona, colest-5-en-3-ona y colest-3,5-dien-7-ona.	—	Según Itoh <i>et al.</i> , 1973.
Missler <i>et al.</i> , 1985.,	Fórmulas en polvo a base de huevo obtenidas por atomización con fuente de calor directa o indirecta.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20 α -HC y 6-CCL ^a .	CLO.	—
Morgan y Armstrong, 1987.	Estudio de la obtención de yema de huevo en polvo bajo diferentes condiciones de atomización con fuente de calor indirecta.	α -CE. Método de cuantificación: patrón externo.	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Morgan y Armstrong, 1989.	Estudio de las recuperaciones de diferentes patrones de OE en yema de huevo en polvo.	α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 7-CC y 3 β -hidroxipregn-5-en-7,20-diona ^a (7-cetopregnenolona).	CLO/MET (2:1, v/v).	—

^a Patrón interno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Purificación	Identificación	Cuantificación	Oxisteroles detectados.
Korahani <i>et al.</i> , 1981.	CCF preparativa con gel de sílice.	CCF con gel de sílice: Rf. CG-EM (70 ev).	Derivatización (TMS) con hexametildisilazano/triclorometilsilano (1:1, v/v). CG con CC OV-101 (285 °C).	En colesterol autooxidado se cuantifican: α -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, 7-CC, 20S-HC, colest-3,5-dien-7-ona. Observaciones: se da separación de los patrones ensayados.
Lee <i>et al.</i> , 1985.	1º Columna de gel de sílice. 2º Columna de Florisil-AgNO ₃ .	CCF con gel de sílice: Rf. CLAE: TR.	CLAE con columna de LiChrosorb Si 60: -FM, HEX/ISO (100:10, v/v); -detector, refractómetro.	Cuantificados: α -CE + α -SE, β -CE, 7α -HC + 7α -HS, 7β -HC + 7β HS. Observación: este método no separa los derivados oxidados del colesterol de los del β -sitosterol.
Luby <i>et al.</i> , 1986.	—	CCF con gel de sílice: Rf. CG con CR 3% de SP-2100 (260 °C, presenta poca resolución): TR.	—	Identificados: 7α -HC y 7β -HC.
Missler <i>et al.</i> , 1985.	1º columna de gel de sílice. 2º CLAE preparativa con columna de gel de sílice: -FM, acetato de etilo. -detector, refractómetro.	CG: TR. CG-EM (70 ev).	Derivatización (TMS) con BSTFA. CG (introducción de la muestra en cabeza de columna) con CC DB-1 (de 70 °C → 270 °C a 25 °C/min y de 270 °C → 300 °C a 1 °C/min).	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT, 7-CC.
Morgan y Armstrong, 1987.	Cartucho de gel de sílice (Sep-Pak).	CG: TR.	Sin derivatización. CG con CR 3% OV-17 (de 240 °C → 270 °C a 5 °C/min).	Cuantificados: α -CE + β -CE.
Morgan y Armstrong, 1989.	Cartucho de gel de sílice (Sep-Pak).	CG: TR y CoC.	Derivatización (TMS) con BSTFA. CG con CC HP-17 (de 225 °C → 275 °C a 1 °C/min).	Se calculan las recuperaciones adicionando patrones a yema de huevo en polvo obtenida por liofilización. Esta yema sólo contiene pequeñas cantidades de: 7α -HC, 7β -HC y 7-CC.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Muestra	Patrones de oxisteroles	Extracción	Saponificación
Morgan y Armstrong, 1992.	Estudio de la obtención de yema de huevo en polvo bajo diferentes condiciones de atomización con fuente de calor directa.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 7-CC y 3 β -hidroxipregn-5-en-7,20-diona ^a (7-cetopregnenolona).	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Naber <i>et al.</i> , 1985.	Coolesterol puro y oxidado.	7-HC, 7-CC y 25-HC. Método de cuantificación: patrón externo.	—	KOH metanólica 5 % (en caliente).
Naber y Bigger, 1985.	Se calientan o no las siguientes muestras: huevo completo en polvo atomizado y yema de huevo polvo liofilizada y atomizada.	7-HC, 7-CC y 25-HC. Se comparan dos métodos analíticos: M1 y M2. Método de cuantificación: patrón externo.	M1) —	AOAC, 1975.
			M2) éter metiliterbutílico.	—
Nawar <i>et al.</i> , 1991.	Coolesterol solo o mezclado con aa, TG o FL y calentado a 180 °C.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20 α -HC, 5 α -colest-3,6-diona, colest-4-en-3-ona, colest-3,5-dien, colest-3,5-dien-7-ona, colest-4,6-dien-3-ona y se ensayan 4 posibles PI en forma libre y de acetato eligiéndose como PI el acetato de 5 α -androstan-3 β -ol-17-on ^a .	—	—
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987.	Huevos frescos y estudio de almacenamiento de ovoproductos en polvo obtenidos por atomización.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20 α -HC y 5 α -CL ^a .	HEX/ISO (3:2, v/v).	—
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988a.	Estudio de almacenamiento de quesos rallados y sin rallar y de mantequilla. Mantequilla calentada a diferentes temperaturas durante varios períodos de tiempo. Aceite de mantequilla y aceite de nata.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20 α -HC y 5 α -CL ^a .	HEX/ISO (3:2, v/v).	—
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988b.	Derivados lácteos en polvo (leche completa y desnatada y nata) almacenados durante períodos de diferente duración.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20 α -HC y 5 α -CL ^a .	HEX/ISO (3:2, v/v).	—
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1989.	Manteca de cerdo, bacon, manteca de cerdo conservada bajo diferentes condiciones y bacon frito.	α -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, 20 α -HC, 7 α -hidroxicolest-4-en-3-ona y 5 α -CL ^a .	HEX/ISO (3:2, v/v).	—

^a Patrón interno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Purificación	Identificación	Cuantificación	Oxisteroles detectados.
Morgan y Armstrong, 1992.	Cartucho de gel de sílice (Sep-Pak).	CG: TR y CoC.	Derivatización (TMS) con BSTFA. CG con CC HP-17 (de 225 °C → 275 °C a 1 °C/min).	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC.
Naber <i>et al.</i> , 1985.	—	CLAE: TR y CoC.	CLAE fase reversa con columna de LiChrosorb RP 18: -FM, ACE/ISO/agua (4:5:1, v/v/v); -detector, UV (208 nm).	Cuantificados en colesterol oxidado: 7-HC, 25-HC y 7-CC. El método no separa los isómeros del 7-HC.
Naber y Bigger, 1985.	—	CLAE: TR y CoC.	CLAE fase reversa con columna de LiChrosorb RP 18: -FM, ACE/ISO/agua (4:5:1, v/v/v); -detector, UV (208 nm).	Cuantificados: 25-HC y 7-HC. Observaciones: se dan LD para el método que no separa los isómeros del 7-HC.
	Columna de Biosil HA.	CLAE: TR y CoC.	CLAE con columna de LiChrosorb SI 60: -FM, gradiente de éter metilbutílico/hexano; -detector, UV (208 nm).	Cuantificados: 25-HC y 7-CC. Observaciones: se dan LD para el método que no separa los isómeros del 7-HC.
Nawar <i>et al.</i> , 1991.	Minicolumna de gel de sílice.	CG: TR. CG-EM.	Derivatización (TMS): se ensayan varios reactivos silanizantes y varias condiciones de reacción. CG con CC DB-1 o Ultra-1 (* de 100 °C → 300 °C a 10 °C/min ó *295 °C).	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 7-CC y colest-3,5-dien-7-ona. Observación: se dan FRR.
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987.	1 ^o columna de Lipidex-5000. 2 ^o columna de TEAP-Lipidex. 3 ^o saponificación con NaOH etanólica 2N (en caliente).	CCF con gel de sílice: Rf. CG: TR. CG-EM (40 ev).	Derivatización (TMS) con Tri-Sil. CG con CC de metil silicona (280 °C).	Cuantificados: todos los patrones de OE. Observación: se dan LD.
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988a.	1 ^o cartucho de gel de sílice (Sep-Pak). 2 ^o columna de Lipidex-5000. 3 ^o columna de TEAP-Lipidex. 4 ^o saponificación con NaOH etanólica 2N (en caliente).	CG: TR. CG-EM (40 ev).	Derivatización (TMS) con Tri-Sil. CG con CC de metil silicona (258 °C).	Cuantificados: todos los patrones de OE. Observación: se dan LD.
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988b.	1 ^o cartucho de gel de sílice (Sep-Pak). 2 ^o columna de TEAP-Lipidex. 3 ^o saponificación con NaOH etanólica 2N (en caliente).	CCF con gel de sílice: Rf. CG: TR. CG-EM (40 ev).	Derivatización (TMS) con Tri-Sil. CG con CC de metil silicona (270 °C).	Cuantificados: todos los patrones de OE. Observación: se dan LD.
Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1989.	1 ^o cartucho de gel de sílice (Sep-Pak). 2 ^o columna de Lipidex-5000. 3 ^o columna de TEAP-Lipidex. 4 ^o saponificación con NaOH etanólica 2N (en caliente).	CCF con gel de sílice: Rf. CG: TR. CG-EM (40 ev).	Derivatización (TMS) con Tri-Sil. CG con CC de metil silicona (270 °C).	Cuantificados: α -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC y 20 α -HC. Observación: se identifica el 7 α -hidroxicolest-4-en-3-ona por CG-EM.

* Inicio programa de temperatura de horno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Muestra	Patrones de oxisteroles	Extracción	Saponificación
Park y Addis, 1985a.	Patrones por separado o como mezclas.	α -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 4 β -HC, 6-CCL, colest-3,5-dien-7-ona y 5 α -CL ^a .	—	—
Park y Addis, 1985b.	Patatas fritas; pollo frito; concentrados de cerebro e hígado; carne, hígado y cerebro de buey; etc.	7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 3 β -hidroxipregn-5-en-7,20-diona ^a (7-cetopregnenolona).	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Park y Addis, 1986a.	Sebo de buey calentado a diferentes temperaturas.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, CT, 7-CC y 5 α -CL ^a .	—	KOH metanólica 2N (en frío).
Park y Addis, 1986b.	Sebo calentado a diferentes temperaturas.	α -CE, 7-CC y 5 α -CL ^a .	—	KOH metanólica 1N (en frío).
Park y Addis, 1987.	Carnes (buey, cerdo y pavo) cocinadas y precocinadas. Carne de cerdo liofilizada almacenada durante tres años.	α -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, CT, 7-CC y 5 α -CL ^a .	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH metanólica 2N (en frío).
Pie <i>et al.</i> , 1990.	Mantequilla calentada a diferentes temperaturas y almacenada durante períodos de diferente duración. Galletas de mantequilla y ovoproductos.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20-HC, 26R-HC, 26S-HC y 19-HC ^a .	Etanol (0.002% BHT)/diclorometano (1:1, v/v). Para la mantequilla se aplica directamente la saponificación.	KOH metanólica 1N (en frío).
Pie <i>et al.</i> , 1991.	Carnes (Buey, ternera y cerdo) frescas, cocidas o almacenadas.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 19-HC ^a .	CLO/MET (2:1, v/v) con 0.002% de BHT.	KOH metanólica 1N (en frío).
Pie y Seillan, 1992.	Aortas de bóvidos, células musculares de tejido liso bovino y monocitos de la línea U937.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 19-HC ^a .	CLO/MET (2:1, v/v) con 0.002% de BHT.	KOH metanólica 1N (en frío).

^a Patrón interno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Purificación	Identificación	Cuantificación	Oxisteroles detectados.
Park y Addis, 1985a.	—	CG: TR. CG-EM de los patrones silanizados (70 ev).	Con o sin derivatización (TMS) Sylon BTZ. CG con CC. Estudio del comportamiento de los patrones ante tres fases estacionarias a diferentes condiciones: DB-1 (* de 200 °C → 260 °C a 3°C/min y * de 180 °C → 250 °C a 3°C/min); DB-5 (* de 220 °C → 260 °C a 4°C/min y * de 230 °C → 260 °C a 2°C/min); y DB-1701 (260 °C).	Se da separación de los patrones bajo las diferentes condiciones ensayadas. Se dan los FRR y la linealidad.
Park y Addis, 1985b.	Minicolumna de gel de sílice.	CLAE: TR y CoC. CG-EM (20 ev).	CLAE con columna de μ -Porasil: -FM, HEX/ISO (93:7, v/v); -detector, UV (208 nm para el 7 α -HC y 7 β -HC y 233 nm para el 7-CC).	Cuantificados: 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC. Observaciones: se dan FRR, linealidad y recuperaciones. Método no válido para cuantificar 25-HC y CT.
Park y Addis, 1986a.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	Con derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 180 °C → 250 °C a 3°C/min).	Cuantificados: todos los patrones de OE. Observaciones: se dan precisión y recuperaciones del método.
Park y Addis, 1986b.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	CG con CC según Park y Addis, 1985a.	Cuantificados: α -CE y 7-CC.
Park y Addis, 1987.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	Con derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 180 °C → 250 °C a 3°C/min).	Cuantificados: todos los patrones de OE.
Pie <i>et al.</i> , 1990.	CCF preparativa con gel de sílice.	CG: TR. CG-EM (70 ev).	Con derivatización (TMS) con hexametildisilazano / triclorometilsilano (1:1, v/v). CG con CC DB-5 (280 °C).	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 20-HC. Observaciones: se dan FRR, linealidad, recuperaciones y LD.
Pie <i>et al.</i> , 1991.	CCF preparativa con gel de sílice.	CG: TR. CG-EM (70 ev).	Con derivatización (TMS) con hexametildisilazano / triclorometilsilano (1:1, v/v). CG con CC DB-5 (280 °C).	Cuantificados: todos los patrones de OE.
Pie y Seillan, 1992.	CCF preparativa con gel de sílice.	CG: TR.	Con derivatización (TMS) con hexametildisilazano / triclorometilsilano (1:1, v/v). CG con CC DB-5 (280 °C).	Cuantificados: todos los patrones de OE.

* Inicio programa de temperatura de horno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Muestra	Patrones de oxisteroles	Extracción	Saponificación
Prasad y Subramanian, 1992.	Mantequilla clarificada (ghee).	CE y CT	—	KOH 15% (en caliente y en atmósfera de nitrógeno).
Sander <i>et al.</i> , 1988.	Estudio de la formación de OE durante la elaboración y almacenamiento de la mantequilla y el queso Cheddar.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 5 α -CL ^a .	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH metanólica 1N (en frío).
Sander <i>et al.</i> , 1989.	Estudio de almacenamiento de derivados lácteos en polvo. Aceite de mantequilla calentado a 110 °C durante diferentes períodos de tiempo.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 5 α -CL ^a .	CLO/MET (2:1, v/v). En el caso del aceite de mantequilla se aplica directamente la saponificación.	KOH metanólica 1N (en frío).
Teng, 1990.	Patrones por separado y como mezclas.	7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, 7-CC, 20 α -HC, 24-HC, 26-HC, 7 α -HPC, 7 β -HPC, 5 α -hidroperoxicolest-6-en-3 β -ol y 5 α -colest-6-en-3 β ,5-diol.	—	—
Teng, 1991.	Patrones por separado y como mezclas.	7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, 7-CC, 20 α -HC, 24-HC, 26-HC, 7 α -HPC, 7 β -HPC, 5 α -hidroperoxicolest-6-en-3 β -ol y 5 α -colest-6-en-3 β ,5-diol.	—	—
Teng <i>et al.</i> , 1973.	Patrones por separado y como mezclas.	7 α -HC, 7 β -HC, 7-CC, 7 α -HPC, 7 β -HPC, 5 α -hidroperoxicolest-6-en-3 β -ol, 5 α -colest-6-en-3 β ,5-diol, colest-3,5-dien-7-ona, colest-4,6-dien-3-ona y colest-2,4,6-trieno.	—	—
Tsai y Hudson, 1981.	Patrones por separado y como mezclas.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 20-HC, 22-CCL, 5 α -CL, 6-CCL, 7-CCL, 5 α -colest-3 β -ol, 5 β -colest-3 β -ol, 5 α -colest-3 β ,6 β -diol, 5 α -colest-3-ona, colest-5-en, colest-5-en-3 α -ol, colest-5-en-3-ona, colest-3,5-dien, colest-3,5-dien-7-ona, colest-5,7-dien-3 β -ol y colest-5,24-dien-3 β -ol (desmosterol).	—	—
Tsai y Hudson, 1984.	Ovoproductos en polvo.	α -CE y β -CE.	Acetona	—

^a Patrón interno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Purificación	Identificación	Cuantificación	Oxisteroles detectados.
Prasad y Subramanian, 1992.	—	CCF con gel de sílice: Rf.	—	Identificados: CE y CT. Observación: el método no distingue entre los dos isómeros del CE.
Sander <i>et al.</i> , 1988.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	CG con CC según Park y Addis, 1985a.	Cuantificados: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, CT y 7-CC.
Sander <i>et al.</i> , 1989.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	Derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 180 °C \rightarrow 250 °C a 3°C/min).	Cuantificados: todos los patrones de OE.
Teng, 1990.	CCF preparativa con gel de sílice para separar algunos OE que no se separan por CLAE.	—	CLAE con columna Ultrasphere SIL: -FM, HEX/ISO (100:2.3, v/v). -detector, UV (205 y 235 nm).	Se da separación de los patrones ensayados.
Teng, 1991.	—	CCF con gel de sílice de las diferentes fases eluidas en CLAE.	CLAE estudio de la separación de los patrones en tres columnas: -Columna y FM, HEX/ISO μ -Porasil 100:3 Ultrasphere SIL 100:2 Zorbax SIL 100:2.2 -detector, UV (234 nm para 7-CC y 210 nm para el resto de OE).	Se dan cromatogramas en donde se ve el orden de elución de los compuestos en las diferentes columnas y la resolución.
Teng <i>et al.</i> , 1973.	CCF preparativa con gel de sílice para comprobar la pureza de los patrones.	—	Sin derivatización. CG con columnas de relleno: 2 y 3% OV-210 y 2 y 3% SP-2401 (en los cuatro casos a 230 °C).	Se da separación en las diferentes columnas de los patrones ensayados.
Tsai y Hudson, 1981.	—	—	CLAE con columna μ -Porasil: -Fases móviles, HEX/ISO (diferentes proporciones, v/v), HEX/acetato de etilo (diferentes proporciones, v/v) y HEX/tetrahidrofurano (diferentes proporciones, v/v). -detector, refractómetro y UV (210 nm) al mismo tiempo.	Se da separación de los patrones con las diferentes fases móviles.
Tsai y Hudson, 1984.	Columna de Bio-Sil HA.	EM (70 ev). IR. ¹ H-RMN (99.5 MHz).	CLAE con columna de LiChrosorb Si 60: -FM, HEX/ISO (98:2, v/v); -detector, refractómetro.	Identificados: α -CE y β -CE.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Muestra	Patrones de oxiesteroles	Extracción	Saponificación
Tsai y Hudson, 1985.	Ovoproductos en polvo. Yema de huevo en polvo obtenida por atomización con fuente de calor directa e indirecta a diferentes temperaturas.	α -CE y β -CE. Patrón externo una mezcla de α -CE + β -CE.	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Tsai <i>et al.</i> , 1980.	Ovoproductos en polvo.	α -CE y β -CE. Patrón externo una mezcla de α -CE + β -CE.	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Van de Bovenkamp <i>et al.</i> , 1988.	Ovoproductos en polvo. Componentes de la dieta holandesa frescos y cocinados.	α -CE, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC, 5 α -CL ^a y betulina ^a .	CLO/MET (2:1, v/v).	—
Yan y White, 1990.	Manteca de cerdo a la que se adicionan distintos niveles de colesterol y se calienta.	α -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 5 α -CL ^a .	—	KOH metanólica 1N (en frío).
Zhang y Addis, 1990.	Estudio de la formación de OE en un medio de fritura (sebo 90%/aceite de semilla de algodón 10%) durante la cocción de patatas.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 5 α -CL ^a .	—	KOH metanólica 1N (en frío).
Zhang <i>et al.</i> , 1991.	Patatas fritas en medio de fritura mezcla de grasa animal y aceite vegetal.	α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 5 α -CL ^a .	CLO/MET (2:1, v/v).	KOH metanólica 1N (en frío).
Zubillaga y Maerker, 1991.	Carnes (pollo, ternera, buey y cerdo) frescas y almacenadas durante diferentes períodos.	α -CE, β -CE, 7-CC y 6-CCL ^a	En columna de una mezcla de gel de sílice + Celita 545 + CaHPO ₄ · 2H ₂ O. Elución con fracciones de polaridad creciente.	—

^a Patrón interno.

Tabla 2-Métodos en la identificación y/o cuantificación de OE.

Referencia bibliográfica	Purificación	Identificación	Cuantificación	Oxisteroles detectados.
Tsai y Hudson, 1985.	Minicolumna de gel de sílice.	según Tsai y Hudson, 1984.	Sin derivatización. CG con CR 3% OV-17 (de 225 °C → 265 °C a 4 °C) no separa los dos isómeros del CE. CLAE con columna de μ -Porasil: -FM, HEX/ISO (100:3, v/v); -detector, refractómetro. Separa los isómeros del CE y permite calcular la relación α -CE/ β -CE.	Cuantificados: α -CE y β -CE, con CG se halla el total de CE y con CLAE se halla la relación entre los dos isómeros.
Tsai <i>et al.</i> , 1980.	Minicolumna de gel de sílice.	CG: TR. CLAE: TR.	Sin derivatización. CG con CR 3% OV-17 (de 225 °C → 265 °C a 4 °C) no separa los dos isómeros del CE. CLAE con columna de μ -Porasil: -FM, HEX/ISO (100:3, v/v); -detector, refractómetro. Separa los isómeros del CE y permite calcular la relación α -CE/ β -CE.	Cuantificados: α -CE y β -CE, con CG se halla el total de CE y con CLAE se halla la relación entre los dos isómeros. Observaciones: se dan precisión y recuperación para CG y precisión para CLAE.
Van de Bovenkamp <i>et al.</i> , 1988.	1 ^o columna de gel de sílice. 2 ^o columna de gel de sílice.	CG: TR. CG-EM.	Derivatización (TMS) con hexametildisilazano/triclorometilsilan (2:1, v/v). CG (introducción de la muestra directamente en cabeza de columna) con CC CP-Sil 5 CB (de 70 °C → 200 °C a 15°C/min y de 200 °C → 295 °C a 10°C/min).	Cuantificados: todos los patrones de OE. Observaciones: se dan FRR, precisión, recuperaciones y LD.
Yan y White, 1990.	—	CG: TR. CG-EM.	Derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 80 °C → 250 °C a 3°C/min).	Cuantificados: α -CE, 7α -HC, 7β -HC, CT y 7-CC.
Zhang y Addis, 1990.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	Derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 180 °C → 250 °C a 3°C/min).	Cuantificados: todos los patrones de OE.
Zhang <i>et al.</i> , 1991.	—	CG: TR y CoC. CG-EM (70 ev).	Derivatización (TMS) con Sylon BTZ. CG con CC DB-1 (de 180 °C → 250 °C a 3°C/min).	Cuantificados: todos los patrones de OE.
Zubillaga y Maerker, 1991.	CCF preparativa con gel de sílice.	CG: TR y CoC.	Sin derivatización. CG con CC Ultra-2 (3 min a 100 °C, de 100 °C → 260 °C a 30 °C/min, de 260 °C → 280 °C a 0.6 °C/min, de 280 °C → 310 °C a 30 °C).	Cuantificados: todos los patrones de OE. Observación: se dan recuperaciones.

* Inicio programa de temperatura de horno.

Por otro lado, en algunos trabajos recientes, la extracción de los OE de la carne se realiza eluyendo con cloruro de metileno/metanol (9:1, v/v) (Higley *et al.*, 1986) o con fracciones de polaridad creciente (Zubillaga y Maerker, 1991), una columna formada por una base de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + Celita 545 (Higley *et al.*, 1986) o de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + Celita 545 + gel de sílice (Zubillaga y Maerker, 1991) sobre la cual se deposita un triturado de la muestra con sulfato sódico anhidro + Celita 545. Fontana *et al.*, también en un trabajo reciente (1992), extrajeron los OE de la yema de huevo en polvo depositando la muestra en la parte superior de una columna de gel de sílice; sobre la muestra se dispuso una fina capa de gel de sílice y se eluyó la columna con fracciones de polaridad creciente. Con este sistema de extracción se consigue un fraccionamiento de los lípidos de la muestra, constituyendo esta etapa una primera purificación en la que se recogen los eluatos más polares que contienen los OE y se descartan los más apolares que contienen TG y la mayor parte del colesterol (Fontana *et al.*, 1992; Zubillaga y Maerker, 1991), mientras que los FL quedan retenidos mayoritariamente en la columna (Zubillaga y Maerker, 1991).

El hexano ha sido utilizado para extraer la fracción lipídica en el análisis de OE en mantequilla (Parks *et al.*, 1966) y leche en polvo desnatada (Flanagan *et al.*, 1975). No obstante, algunos de los oxisteroles más polares como el CT son poco solubles en disolventes apolares como el éter de petróleo o el hexano, con lo cual es cuestionable la extracción de la fracción lipídica con estos disolventes para el análisis de OE. Además, en el caso de la mantequilla se suele omitir la fase de extracción pasándose directamente a la saponificación.

3. PURIFICACIÓN DE LOS OXIESTEROLES.

Como ya hemos señalado, los OE en caso de estar presentes en la fracción lipídica lo están a nivel traza. Este hecho hace necesaria una purificación de los OE más o menos exhaustiva en función de la muestra, lo cual, a la vez, contribuye al aumento de sensibilidad del método analítico. Esta purificación puede conseguirse con la aplicación aislada o combinada de saponificación, cromatografía en columna y CCF.

3.1. SAPONIFICACIÓN.

La saponificación en el análisis de OE se aplica normalmente sobre la fracción grasa, aunque en algunos casos se realiza directamente sobre la muestra, omitiéndose por tanto la etapa de extracción lipídica (Doormaal *et al.*, 1989; Gruenke *et al.*, 1987; Koopman *et al.*, 1987; Naber y Bigger, 1985). Según Bascul *et al.* (1986) una saponificación no suficientemente enérgica exige una purificación previa a la determinación cromatográfica de los OE, por lo que recomienda que la saponificación se lleve a cabo con KOH metanólica en caliente durante 2 hr. La saponificación en caliente ha sido empleada por diversos autores (tabla 2) pero paulatinamente se va sustituyendo por la saponificación en frío. La razón de esta sustitución se encuentra en la demostración por parte de diversos autores de la inestabilidad del 7-CC y colesterol-5 α ,6 α -epóxido en caliente y en medio alcalino.

La inestabilidad del 7-CC en caliente y en medio alcalino se conoce desde hace muchos años, cuando Bergström y Wintersteiner (1941) señalaron que este compuesto se descomponía básicamente en colest-3,5-dien-7-ona. Posteriormente, otros autores confirmaron esta observación (Chicoye *et al.*, 1968b, c; Higley *et al.*, 1986; Maerker y Unruh, 1986).

Algunos trabajos concluyen que en caliente y en medio alcalino también se produce descomposición del α -CE en CT por hidrólisis del anillo epóxido. Así, por ejemplo, en un trabajo de Tsai *et al.* (1980) se observa que la recuperación del α -CE tras la saponificación con KOH metanólica en caliente es tan sólo del 25%.

Estos problemas de estabilidad con el 7-CC y α -CE no se presentan con la saponificación en frío. Así, diversos autores que aplican este método de saponificación obtuvieron recuperaciones buenas para estos dos compuestos (Chicoye *et al.*, 1968a; Park y Addis, 1986a, Pie *et al.*, 1990). No obstante, la controversia se inicia con los resultados de Van de Bovenkamp *et al.* (1988) según los cuales el 7-CC se recupera entre un 11-40% tras la saponificación en frío y no se recupera tras la saponificación en caliente.

A pesar de estos resultados de Van de Bovenkamp existe un hecho evidente y es que el análisis del contenido de OE en diversos alimentos, mediante métodos en los que se aplica la saponificación en frío, da como resultado que el OE mayoritario es el 7-CC y, por otro lado, no aparece la colest-3,5-dien-7-ona.

La colest-3,5-dien-7-ona se encuentra entre los derivados oxidados que se forman a partir del colesterol cuando éste se calienta (Korahani *et al.*, 1981; Nawar *et al.*, 1991), pero es un compuesto que se ha detectado en pocas ocasiones en alimentos y cuando esto ha sucedido ha sido, normalmente, mediante métodos que aplican la saponificación en caliente (Bascoul *et al.*, 1986; Pennock *et al.*, 1962; Ryan *et al.*, 1981).

Por otro lado, también existe controversia alrededor de si la saponificación en caliente implica o no la formación de derivados oxidados a partir del colesterol. Según Bascoul *et al.* (1986) la saponificación en caliente con KOH metanólica 1N durante 2 hr no implica oxidación del colesterol, en cambio otros autores señalan la oxidación del colesterol durante la saponificación en caliente (Maerker y Unruh, 1986; Naber y Bigger, 1985). Según diversos autores esta oxidación no tiene lugar cuando la saponificación es en frío (Pie y Seillan, 1992; Pie *et al.*, 1990). No obstante, Maerker y Unruh (1986) señalaron la formación de pequeñas cantidades de OE incluso en un método en el que no se realizaba saponificación. En este último trabajo se comprobó que esta formación no se evitaba ni en presencia de 3,5-di-ter-butyl-4-hidroxitolueno (BHT) ni de otros antioxidantes fenólicos.

Sean cuales sean las condiciones bajo las que se efectúe la saponificación, la extracción de la materia insaponificable se realiza en la mayoría de ocasiones con éter etílico, aunque Bascoul *et al.* (1986) la realizaron con diclorometano.

3.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.

La cromatografía en columna para purificar los OE se puede aplicar directamente sobre los lípidos totales procedentes de la extracción o sobre la materia insaponificable procedente de la saponificación. Además, tras esta fase se puede pasar a una posterior purificación o directamente a la determinación cromatográfica (tabla 2).

El tipo de cromatografía en columna más usada es la de adsorción con gel de sílice, en este caso la purificación se consigue eluyendo la columna con fracciones de polaridad creciente (tabla 2) y de esta manera los componentes de la fracción lipídica eluyen en el siguiente orden: ésteres del colesterol, TG, colesterol libre y FL. En algún trabajo, con este sistema se consiguen incluso separar los diferentes OE en función de su polaridad. Este es el caso del trabajo de Van de Bovenkamp *et al.* (1988) en el que se realizó la purificación con dos columnas de gel de sílice. La fracción lipídica extraída de la muestra se redisolvió en cloroformo y se aplicó sobre la primera de estas columnas; el colesterol esterificado y los TG fueron eluidos con 175 ml de cloroformo; y el colesterol libre y los OE lo fueron con 150 ml de acetona. Los FL quedaron retenidos en la columna. Los 150 ml de acetona se evaporaron y el residuo seco se redisolvió en 3 ml de cloroformo/acetona (98:2, v/v) que se aplicaron sobre la segunda columna de gel de sílice. La columna se eluyó con 100 ml de cada una de las siguientes mezclas cloroformo/acetona: A (98:2, v/v), B (80:20, v/v) y C (50:50, v/v). Con la fracción A eluyeron colesterol y colestanol; con la B, 25-HC, α -CE, 7-CC y la mayor parte de 7 β -HC; y con la C, CT y una pequeña cantidad de 7 β -HC. La fracción A se descartó y en las otras dos fracciones se determinó, por separado, el contenido en OE mediante CG.

Cabe reseñar que en los trabajos en que se utilizan las columnas de gel de sílice existe una marcada tendencia al uso de columnas cada vez más pequeñas, ya que presentan la misma funcionalidad que las grandes y suponen un ahorro de disolventes. Estas minicolumnas pueden prepararse rellenando columnas de pequeño tamaño (Hwang y Maerker, 1993; Nawar *et al.*, 1991; Park y Addis, 1985b) o incluso pipetas desechables de pequeño volumen (Tsai y Hudson, 1985; Tsai *et al.*, 1980) o bien pueden comprarse ya preparadas. Entre las preparadas las más utilizadas son los cartuchos de gel de sílice (Sep-Pak, Waters división de

Millipore) (tabla 2). Actualmente, cada vez es más frecuente que esta sea la única etapa de purificación en los métodos analíticos, incluso cuando se trabaja con mezclas tan complejas como los provenientes del huevo y ovoproductos (tabla 2).

Otro de los tipos de cromatografía en columna capaz de separar los OE de los FL y TG es la de exclusión molecular. Esta cromatografía ha sido aplicada recientemente al análisis de OE. Los primeros en utilizarla (columna de Lipidex-5000) asociada a la cromatografía de intercambio iónico (columna de TEAP-Lipidex) fueron Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1987). Posteriormente, estos mismos autores asociaron una cromatografía con cartucho de gel de sílice (Sep-Pak) a los dos tipos de cromatografía citados anteriormente (Nourooz-Zadeh y Appelqvist 1988a, 1989). En relación con la cromatografía de exclusión Nawar *et al.* (1991) comprobaron que era efectiva, pero que, sin embargo, requería mucho tiempo (columna de Styragel).

Otra modalidad de cromatografía en columna que ha sido utilizada por algunos autores y siempre asociada a otros sistemas de purificación es la secuestrante o de argentación (columna de Florisil-AgNO₃) (tabla 2).

Finalmente, cabe señalar la CLAE preparativa como método de purificación. Este sistema fue utilizado por Csiky (1982) previamente a la determinación de los OE por CLAE y por Missler *et al.* (1985) asociado a la cromatografía en columna de gel de sílice también de forma previa la determinación de los OE por CLAE. Fontana *et al.* (1992), para determinar los OE por espectroscopía de RMN, aplicaron una purificación muy exhaustiva mediante doble CLAE preparativa.

3.3.CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA.

La CCF con gel de sílice ha sido ampliamente utilizada para aislar los esteroides del resto de la fracción lipídica y por tanto también se ha aplicado en el análisis de OE. Para aislar los OE por este método, se eluyen los lípidos en la placa de gel de sílice y se rasca la banda correspondiente a estos compuestos. Esta banda en función de la elución puede contener básicamente OE o también colesterol y esteroides vegetales. Pie en sus distintos trabajos

mediante CCF consiguió separar los oxisteroles del colesterol (Pie y Seillan, 1992; Pie *et al.*, 1990, 1991) y lo mismo consiguieron Finocchiaro *et al.* (1984).

En algunos trabajos, mediante esta técnica, se fraccionaron incluso los oxisteroles (figura 1) (Pie y Seillan, 1992; Pie *et al.*, 1991).

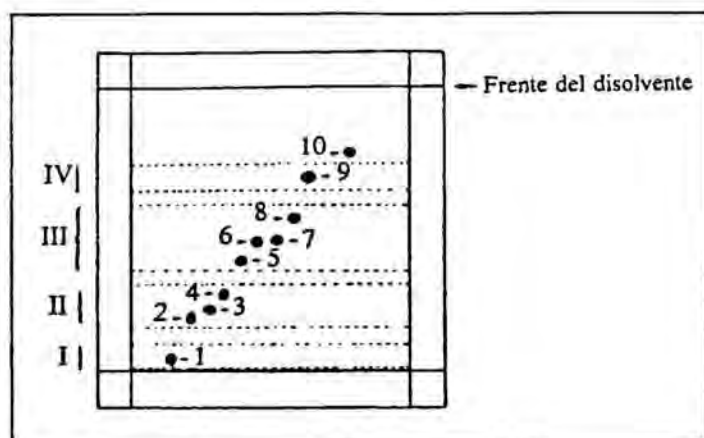


Figura 1-Migración de los patrones eluidos en una placa de gel de sílice con hexano/éter dietílico/acetato de etilo (50:50:50). 1, CT; 2, 7 α -HC; 3, 19-HC; 4, 7 β -HC; 5, 7-CC; 6, α -CE; 7, β -CE; 8, 25-HC; 9, 20-HC; y 10, colesterol (Pie y Seillan, 1992). Cuando se trabaja con muestras reales se rascan, extraen y analizan separadamente por CG las 4 bandas marcadas en la figura con números romanos.

4. SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS OXISTEROLES.

Para conseguir identificar los diferentes oxisteroles es necesario un método con una buena resolución y alta sensibilidad. Estos dos requisitos son todavía más indispensables si, como es habitual, se quiere realizar la cuantificación. Esta cuantificación de los OE normalmente se realiza por CG o CLAE, aunque en algunos ocasiones se hace por CCF. Cada una de estas técnicas cromatográficas se caracteriza por su resolución y por los sistemas de identificación y cuantificación que en ellas se emplean. No obstante, la identificación mediante estas técnicas no debería considerarse definitiva y se debería comprobar por espectrometría de masas.

Recientemente, Fontana *et al.* (1992) cuantificó los OE por espectroscopía $^1\text{H-RMN}$, tras la purificación exhaustiva de cada OE mediante una doble CLAE preparativa.

4.1.LA CROMATOGRAFÍA DE GASES.

La cromatografía de gases es el método más utilizado para la determinación de OE en alimentos y muestras biológicas. Inicialmente, se utilizaban columnas de relleno con fases apolares como: SE-30 (100% metil silicona), OV-17 (50% fenilmetil silicona), QF-1 o OV-210 (50% 3,3,3-trifluoropropil silicona), etc. No obstante, actualmente estas columnas han caído prácticamente en desuso, siendo sustituidas por columnas capilares con fases muy apolares como las de 100% metil silicona (DB-1, CP-Sil 5 CB, Ultra-1, OV-101, etc) o un poco menos apolares como las de 5% fenil + metil silicona (DB-5, CP-Sil 8 CB, Ultra-2, SE-54, etc). En alguna ocasión (Morgan y Armstrong, 1989, 1992) también se han utilizado fases con polaridad intermedia como las de 50% fenil + 50% metil silicona (HP-17).

En relación con la polaridad de estas columnas, Park y Addis (1985a) realizaron un estudio en donde compararon la separación que se obtenía con tres columnas de polaridad creciente, DB-1, DB-5 y DB-1701 (1% vinil + 7% fenil + 7% cianopropil + 85% metil silicona), llegando a la conclusión de que la columna más apolar era la que mejor resolución proveía.

Toda columna empleada en la determinación de OE debe resistir elevadas temperaturas, ya que el punto de ebullición de estos compuestos o de sus derivados silanizados es bastante elevado.

4.1.1.SEPARACIÓN.

Indiscutiblemente, las columnas capilares con fases apolares son las que proporcionan una mayor resolución. La resolución también se ve incrementada mediante la derivatización de los OE en forma de trimetilsilil éteres (TMS). Mediante esta silanización se produce un cambio en los TR y en el orden de elución de los OE (TMS); y, al mismo tiempo, se

obtienen picos más estrechos y simétricos, aumentando el número de platos teóricos (Figura 2). Además, mediante esta derivatización se consiguen derivados silanizados con mayor termoestabilidad que los propios OE, con lo cual se evita el problema de descomposición térmica descrito para los 7-HCs y otros hidroxicolesteros no derivatizados (Park y Addis, 1985a; Teng *et al.*, 1973; Van Lier y Smith, 1968).

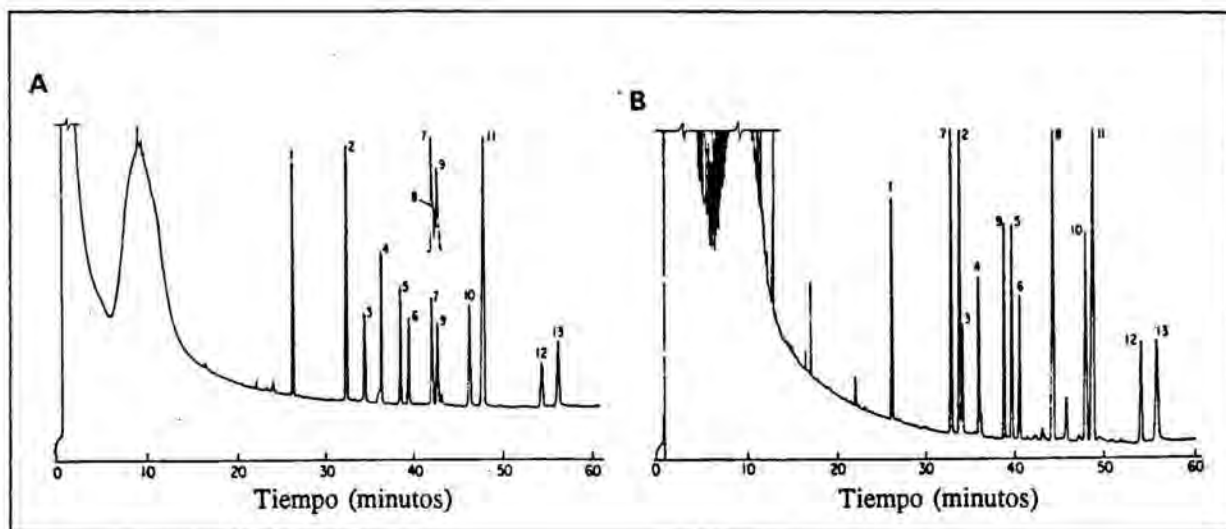


Figura 2-Cromatograma de patrones de OE. (A) Sin derivatizar. (B) En forma de trimetilsilil éteres. 1, tetradecanoato de tetradecilo; 2, colesterol; 3, 5 α -colestano-3-ona; 4, 3,5-colestadien-7-ona; 5, β -CE; 6, α -CE; 7, 7 α -HC; 8, 25-HC; 9, 7 β -HC; 10, 6-CCL; 11, 7-CC; 12, 3 β ,5 α -dihidroxicolestan-6-ona; 13, CT (Maerker y Unruh, 1986).

La silanización de los OE se puede lograr mediante una serie de agentes silanizantes, entre los cuales se encuentran: hexametildisilazano (HMDS), N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-trimetilsililimidazol (TMSI), etc. Como catalizador de esta reacción se suele utilizar el triclorometilsilano (TMCS). Para conseguir esta silanización, normalmente, se disuelve el concentrado final de OE en piridina y se añade el agente silanizante o una mezcla de éste con el catalizador. Las condiciones de reacción dependen, esencialmente, del agente silanizante empleado, siendo el Sylon BTZ (BSA/TMCS/TMSI, 3:2:3, v/v/v) una de las mezclas silanizantes más potentes y por tanto, también, una de las más empleadas. Concretamente, con esta mezcla de reactivos con sólo 20-30 minutos a temperatura ambiente se consiguen los trimetilsilil éteres. Cabe tener en

cuenta que tanto el concentrado de OE como la piridina no deben presentar, en absoluto, humedad, ya que en esta reacción el agua compite con los grupos hidroxil de los OE, con lo cual en su presencia la silanización puede ser incompleta. Por otro lado, estos derivados silanizados permanecen sin hidrolizarse tan sólo unos días a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La separación de estos derivados silanizados en columnas capilares apolares (100% metil silicona y 5% fenil + metil silicona) ha sido ampliamente estudiada (Korahani *et al.*, 1981; Park y Addis, 1985a; Pie *et al.*, 1990). Se ha observado que en función de la fase varía el TR y orden de elución de los analitos (figura 3).

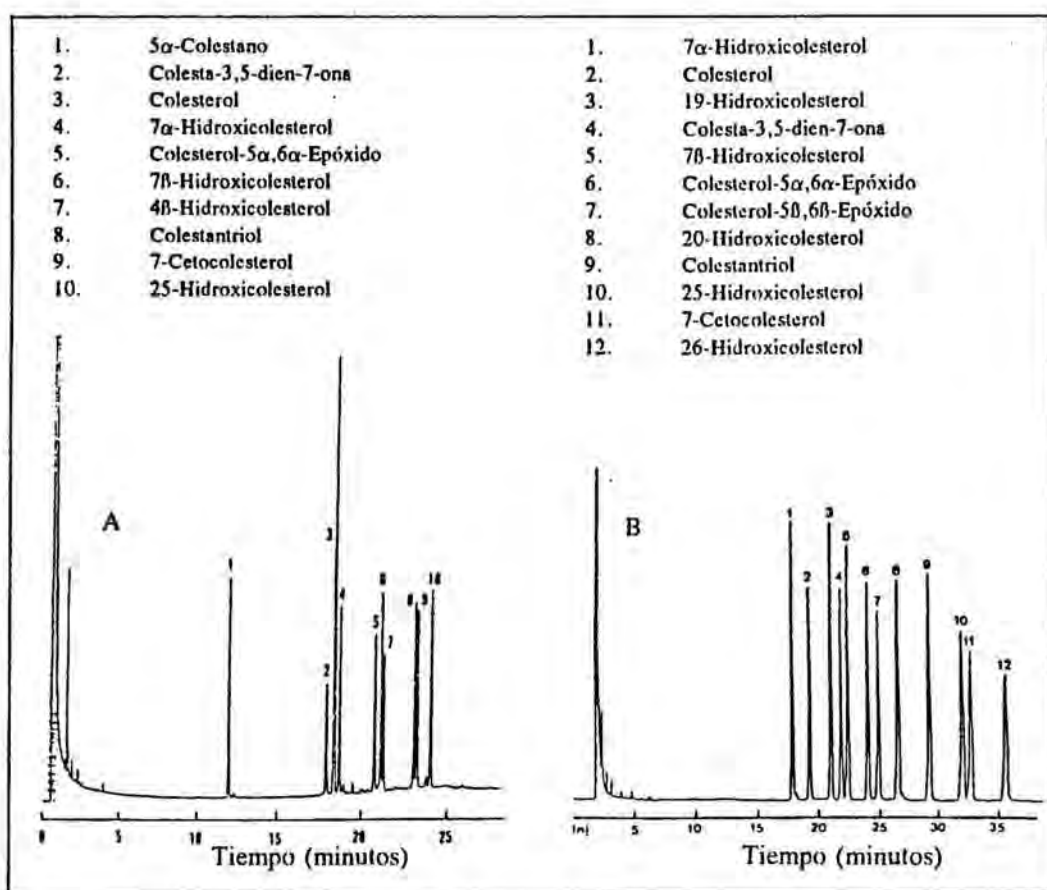


Figura 3-Separación de patrones derivatizados de OE (TMS) en columnas de diferente polaridad. (A) columna de metil silicona (Park y Addis, 1985a). (B) columna de 5% fenil+ 95% metil silicona (Pie *et al.*, 1990).

La inyección de las muestras, mayoritariamente, se realiza trabajando con la técnica de partición (split). No obstante, algunos autores trabajan con inyección de la muestra directamente en la cabeza de la columna (on-column) (tabla 2). Con esta última técnica, se evita el problema de la discriminación, que muy posiblemente también se presente en el análisis de los OE (apartado IV.A.2.1.1.1., p 164).

4.1.2.IDENTIFICACIÓN.

Una primera aproximación de la identidad de los picos de una muestra se realiza comparando los TR de los patrones de OE con los de los picos de dicha muestra. A continuación, se vuelve a inyectar la muestra adicionada de uno o varios de los patrones de OE, que presumiblemente corresponden a alguno de los picos de esta muestra. La adición se realiza de tal manera que la cantidad de patrón añadida suponga un aumento en el área del pico problema de entre un 50-100 %. Esta mezcla muestra-patrón(es) se inyecta en el cromatógrafo de gases utilizando diferentes programas de temperatura de horno. Si pico y patrón corresponden a un mismo compuesto se obtendrá, con todos los programas de temperatura ensayados, un pico completamente simétrico. Para los compuestos mayoritarios, previamente a la adición de patrón, se realiza una dilución para trabajar con picos pequeños, en los cuales se observa más fácilmente asimetría o desdoblamiento si pico y patrón no son el mismo compuesto. Con esta técnica de adición de patrones llamada también Cocromatografía se consigue una identificación bastante exacta que en algunas ocasiones es comprobada por CCF con gel de sílice o por CLAE (tabla 2). Una vez realizada la identificación se puede pasar a la cuantificación, pero teniendo en cuenta que es prácticamente indispensable confirmar la identificación mediante EM.

4.1.3.CUANTIFICACIÓN.

La cuantificación por CG debe presentar como característica más importante una buena repetibilidad. Para ello, se debe optimizar, en primer lugar, el método cromatográfico (condiciones de silanización, conservación de los derivados silanizados, condiciones cromatográficas, condiciones de integración, etc.) y, a continuación, todo el método analítico en sus diferentes fases.

La cuantificación normalmente se realiza por el método del patrón interno, aunque algunos autores han utilizado el del patrón externo (Morgan y Armstrong, 1987; Tsai y Hudson, 1985; Tsai *et al.*, 1980). El patrón interno debe añadirse a la muestra cuanto antes mejor. Con toda certeza, el compuesto más utilizado como PI es el 5 α -colestano, este compuesto puede añadirse sobre la muestra, siempre y cuando, no se realice una purificación por CCF con gel de sílice o en columna del mismo material, ya que en estos dos casos el 5 α -colestano eluye con los componentes más apolares de la fracción lipídica y no se recoge junto a los OE. La solución a este problema es buscar un patrón que eluya junto a los OE, como en los trabajos de Pie (Pie y Seillan, 1992; Pie *et al.*, 1990, 1991), o bien seguir trabajando con el 5 α -colestano, pero añadiéndolo tras la purificación (normalmente previamente a la silanización). En este último caso el PI corrige esencialmente la variabilidad en los volúmenes inyectados, mientras que si se añade al principio corrige, entre otros errores, las posibles pérdidas durante la manipulación de la muestra. La cuantificación utilizando el PI se puede realizar básicamente de dos maneras:

- 1) utilizando los factores de respuesta relativos (FRR);
- 2) utilizando la curva de calibrado.

1) Los FRR se calculan tras la inyección de mezclas de patrones mediante la fórmula:

$$\text{FRR} = \frac{P_{px} \cdot A_{pi}}{A_{px} \cdot P_{pi}}$$

P_{px} = peso patrón de OE;

A_{px} = área patrón de OE;

P_{pi} = peso de patrón interno;

A_{pi} = área de patrón interno.

Esta fórmula es igualmente válida utilizando las alturas de los picos en lugar de las áreas. Estos factores de respuesta tienen en cuenta la diferente respuesta de los OE frente al detector de ionización de llama. La concentración de un analito en la muestra se puede calcular según la fórmula siguiente:

$$P_x/P_m = (FRR A_x P_{pi})/(A_{pi} P_m)$$

P_x = peso de OE;

A_x = área de OE;

P_m = peso de muestra;

FRR = factor de respuesta relativo.

Los FRR de los diferentes OE se pueden calcular inyectando un número "n" de mezclas con la misma concentración de cada uno de los patrones. No obstante, es mucho más exacto realizar este cálculo inyectando una serie de mezclas que contengan una concentración creciente de los patrones de OE y constante de PI.

2) Las curvas de calibrado de los OE se obtienen, precisamente, inyectando mezclas de patrones con concentraciones crecientes de los OE y una misma concentración de PI. De esta manera, para cada OE, se puede obtener su curva de calibrado que viene dada por la recta de regresión de y (A_{px}/A_{pi}) sobre x (P_{px}/P_{pi}). La fórmula de esta recta es, $y = a + bx$. El coeficiente de determinación (r^2) de la recta expresa la linealidad de la respuesta. La ordenada en el origen de esta recta (a) tiene que presentar un valor cercano al 0, en caso contrario sería necesario revisar la determinación cromatográfica para encontrar la fuente de error. Para calcular la concentración de analito en una muestra se emplea la ecuación de la curva de calibrado:

$$y = a + bx; A_{px}/A_{pi} = a + b P_{px}/P_{pi}$$

a = ordenada en el origen;

b = pendiente de la recta.

De aquí,

$$P_x = P_{pi} (A_x/A_{pi} - a)/b$$

Una vez calculado P_x se refiere a la cantidad de muestra de partida y se obtiene la concentración.

Evidentemente, a partir de los datos de la curva de calibrado se pueden calcular los FRR con la fórmula que se ha dado anteriormente.

Este segundo método de cuantificación es más exacto que el primero. Además, la exactitud de ambos métodos puede mejorarse teniendo en cuenta, para el cálculo de la concentración de los analitos en la muestra, su recuperación y la del PI a lo largo del método analítico.

4.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA.

En el análisis de OE, la CLAE va abriéndose camino, día a día, frente al método ampliamente estudiado y utilizado de la CG. Para la determinación de los OE por CLAE se han utilizado columnas con fase normal de gel de sílice y con fase inversa. En las columnas con fase normal la separación tiene lugar por adsorción mientras que en la fase inversa se produce por partición. Otra diferencia son las fases móviles utilizadas, apolares para la CLAE con fase normal y polares para la CLAE con fase inversa. De estos dos tipos de columna las más introducidas en este análisis son las de fase normal.

La CLAE presenta ventajas y desventajas frente a la CG. Entre las ventajas están la no presencia de problemas de descomposición térmica y que es un análisis con detección no destructiva, con lo cual se pueden recoger los eluatos para posteriores determinaciones, como por ejemplo, para la identificación. No obstante, presenta como desventaja que algunos de los OE son difícilmente detectables por los sistemas de detección utilizados en la CLAE.

4.2.1.RESOLUCIÓN.

Existen una serie de trabajos en los que se evalúa muy profundamente la capacidad resolutive de esta técnica con diferentes columnas y fases móviles (Teng, 1990, 1991; Tsai y Hudson, 1981). Para ello, en estos trabajos se utiliza un amplio número de patrones. De los tres estudios citados, en los tres se trabaja con fase normal y posiblemente el más destacable es el de Tsai y Hudson. En este trabajo se compara la separación de 24 patrones en una columna de μ -Porasil utilizando diferentes fases móviles. Las fases móviles ensayadas son las siguientes mezclas de disolventes, a diferentes proporciones: hexano/isopropanol, hexano/tetrahidrofurano y hexano/acetato de etilo. De todas estas fases móviles, la mezcla hexano/isopropanol (100:3, v/v) resultó ser la que proporcionaba una mejor separación. En este trabajo se da el factor de capacidad (K') de cada uno de los 24 compuestos para esta mezcla. K' es un parámetro característico de cada compuesto para una columna y fase móvil determinadas e independiente de la velocidad de flujo del eluyente, a diferencia del TR. El valor de este factor decrece con la adición al hexano de disolventes polares. El disolvente que provoca una mayor disminución de K' es el isopropanol y, a continuación, el tetrahidrofurano y el acetato de etilo, por este orden. De esta manera, el colesterol fue eluido con una K' de 1.0 con hexano/isopropanol (100:3), hexano/tetrahidrofurano (100:30) o hexano/acetato de etilo (100:40). Otra de las conclusiones interesantes de este trabajo fue que existe una relación entre el valor de K' de un compuesto y su estructura. La introducción de funciones oxigenadas en la molécula del colesterol implica un aumento de K' , el cual depende de la capacidad de la función introducida para formar puentes de hidrógeno y de la posición y orientación en la que se realiza dicha introducción. Este aumento es creciente en el siguiente orden: carbonilo en cadena lateral, hidroxilo en cadena lateral, epóxido en el anillo B, carbonilo en el anillo B e hidroxilo en el anillo B (tabla 3). La introducción de un grupo polar, ya sea hidroxilo o carbonilo, sobre la molécula de colesterol influye en diferente magnitud sobre el valor de K' en función de que se realice sobre la cadena lateral o el anillo B. Según estos autores, esto obedece a que el compuesto, que posee dos grupos polares, cuando se adsorbe en la fase estacionaria mediante la formación de un puente de hidrógeno a través de uno de estos dos grupos, el otro grupo queda mucho más accesible para la fase móvil cuanto más separado esté de él. Esto explica, por ejemplo, que los factores de capacidad del colest-5-en-3 β ,25-diol, colest-5-en-3 β ,7 β -diol y colest-5-en-3 β ,7 α -diol con

hexano/isopropanol (100:3) fueran 2.9, 18.5 y 21.7, respectivamente. Según estos datos vemos que también influye sobre el valor de K' la orientación del grupo hidroxilo de C-7. Esto es debido a que cuando este grupo se encuentra situado ecuatorialmente (7β -HC) el impedimento estérico causado por los hidrógenos de C-15 es mucho mayor que cuando se sitúa axialmente (7α -HC). Un caso particular es el del CT, compuesto en el cual existen tres grupos hidroxilos, dos más que en el colesterol, situados muy próximos entre ellos. Este hecho confiere al compuesto un valor de K' muy elevado cuando se trabaja con hexano/isopropanol (100:3, v/v), con lo cual se obtiene un pico muy ancho y tardío, difícilmente cuantificable. La solución a este problema es utilizar una fase móvil más polar (hexano/isopropanol, 100:10, v/v) con lo cual el compuesto eluye antes, pero como contrapartida el uso de esta fase móvil (FM) implica una gran disminución en la resolución de los compuestos menos polares.

Tabla 3-Factores de capacidad (K' *) en una columna de μ -Porasil de una serie compuestos con el núcleo del colestano (Tsai y Hudson, 1981).

PATRONES	FASE MÓVIL		
	HEX/ISO (100:3)	HEX/ISO (100:10)	HEX/acetato de etilo (100:5)
	K'	K'	K'
5 α -colestano	0.05		0.05
colest-5-en	0.05		0.05
colesta-3,5-dien	0.05		0.05
colesta-3,5-dien-7-ona	0.14		0.70
5 α -colestano-3-ona	0.22		1.4
colest-5-en-3-ona	0.30		1.6
colest-5-en-3 α -ol	0.46		5.1
5 β -colestano-3 β -ol	0.70		6.5
colest-5-en-3 β -ol	1.0	0.38	10.4
5 α -colestano-3 β -ol	1.1		
colesta-5,24-dien-3 β -ol	1.2		
colesta-5,7-dien-3 β -ol	1.2		
3 β -hidroxicolest-5-en-22-ona	1.4		
colest-5-en-3 β ,20-diol	1.5	0.38	
colest-5-en-3 β ,25-diol	2.9	0.70	
5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol	4.4	1.0	
5,6 β -epoxi-5 β -colestano-3 β -ol	5.0		
3 β -hidroxi-5 α -colestano-6-ona	5.8		
3 β -hidroxi-5 α -colestano-7-ona	7.3		
3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona	7.6	1.4	
colest-5-en-3 β ,7 β -diol	18.5	2.2	
colest-5-en-3 β ,7 α -diol	21.7	2.7	
5 α -colestano-3 β ,6 β -diol	21.7	3.1	
5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol	>50.0	12.2	

* $K' = (V_R - V_0)/V_0$, donde V_R es el volúmen de retención del compuesto y V_0 el volúmen de retención de un compuesto no retenido.

En un estudio más reciente de Teng (1990), en donde se utiliza una columna de Ultrasphere SIL, se da la separación con hexano/isopropanol (100:2.3, v/v) de 9 patrones, entre los cuales se encuentran 3 hidroperóxidos. La elución a 0.5 ml/min con esta mezcla de

disolventes no consiguió separar los epímeros del 7-HC y, además, el pico correspondiente al 7 α -HC + 7 β -HC eluyó con un tiempo de retención muy alto. Posteriormente, Teng (1991) realizó un trabajo en el que comparaba la separación de 12 patrones, entre los cuales figuraban 3 hidroperóxidos, en 3 columnas con fase normal y bajo las siguientes condiciones:

Fase estacionaria	FM HEX/ISO (v/v)	Velocidad de flujo
μ -Porasil	100:3	1 ml/min
Ultrasphere SIL	100:2	1 ml/min
Zorbax SIL	100:2.2	1 ml/min

La principal conclusión de este trabajo fue que la resolución de estas columnas depende del número de grupos silanol (Si-OH) superficiales presentes en la columna lo cual depende del tamaño de las partículas de gel de sílice, de su diámetro de poro y, como es lógico, del tamaño de la propia columna. Las columnas de μ -Porasil y Zorbax SIL presentaron mejor resolución que la de Ultrasphere SIL, columna en la cual no se separan los epímeros del 7-HC. No obstante, en el caso de que el objeto del análisis fueran sólo los hidroperóxidos del colesterol esta última columna sería la más indicada por presentar buena resolución y un tiempo de análisis corto para estos compuestos. En estos dos estudios de Teng (1990 y 1991), como en el de Tsai y Hudson (1981), se presentaba el problema de que los compuestos más polares eluían muy tardíamente y con picos muy anchos, difícilmente cuantificables. Este hecho cuestiona la aplicabilidad de estos métodos isocráticos al análisis de muestras. Tanto es así, que sólo se han aplicado para determinar OE de polaridad parecida. Los mismos Tsai y Hudson (1984 y 1985), con posterioridad a su trabajo de 1981, utilizaron la CLAE tan sólo para cuantificar α -CE y β -CE. En relación con el tema existen una serie de trabajos que sólo cuantifican C-7 OE (Herian y Lee, 1985; Park y Addis, 1985b).

Por otro lado, Csallany *et al.* (1989), por ejemplo, desarrollaron un método isocrático utilizando la mezcla hexano/isopropanol (93:7, v/v) con columna de μ -Porasil para determinar C-7 OE, en la misma columna también determinaron 25-HC, pero usando hexano/isopropanol (97:3, v/v). Como hemos visto, los métodos isocráticos no son válidos para la determinación, de una forma precisa y exacta de OE que difieran mucho en polaridad.

La solución a este problema se encuentra en la elución mediante gradientes de polaridad. En un trabajo de Maerker *et al.* (1988), en el que se utilizaron patrones, la elución se programó de la siguiente forma: en 15 min se pasó de 100% de la mezcla A (hexano/isopropanol, 97:3) a 98.5% de A y 1.5% del disolvente B (isopropanol); en los 10 minutos siguientes se llegó hasta el 97 % de A; y finalmente durante los últimos 15 minutos la elución se realizó con 50 % de A y 50 % de B. Con este método se obtuvieron picos simétricos y buena resolución. La aplicación de una elución con un gradiente lineal (0-10 %) de butanol en hexano permitió determinar en mantequilla, al mismo tiempo, 25-HC, 4 β -HC, 7-CC, 7 α -HC y 7 β -HC, con columna de Nucleosil NO₂.

A pesar de esto, la CLAE con fase normal debe evolucionar todavía mucho para poder equipararse, a nivel de funcionalidad, con la CG en el análisis de OE en alimentos y en muestras biológicas.

Por otro lado, la CLAE con fase inversa se encuentra todavía en un estado de evolución menos avanzado, presentando problemas de resolución prácticamente idénticos a los de la CLAE con fase normal. No obstante, el orden de elución de los OE en esta cromatografía es inverso al que se presenta con la fase normal, ya que eluyen primero los OE más polares y después los que lo son menos. El primer OE en eluir es el CT. Así, en un trabajo de Higley *et al.* (1986) se determinan en carnes y productos cárnicos los OE menos polares (22-CC, 19-HC, 6-CC, 7 α -HC y 7 β -HC) por CLAE fase normal y el CT por CLAE fase inversa. De esta manera, se realizan dos análisis para cada muestra, lo cual implica un tiempo de análisis largo, pero, por otro lado, permite una buena resolución y la determinación de un amplio número de compuestos. Entre los estudios en los que se trabaja con fase inversa destaca el de Finocchiaro *et al.* (1984) en el cual se determinan en productos lácteos OE con polaridad bastante diferenciada: CT, 7 α -HC, 7 β -HC, β -CE y α -CE. En este trabajo se utilizó una columna μ -Bondapak C18 y como fase móvil acetonitrilo/agua (9:1, v/v).

4.2.2. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.

El sistema de detección más utilizado en la CLAE es el espectrofotométrico UV (tabla 2). No obstante, no todos los OE absorben en la zona del UV y la mayoría de los que lo hacen, lo hacen débilmente. Concretamente, los colesterol epóxidos y el CT no absorben en esta zona. La mayoría de los OE que se encuentran en alimentos se detectan a longitudes de onda inferiores a 212 nm, constituyendo una excepción a esta regla el 7-CC por detectarse normalmente a 233 nm. En la figura 4 se presentan los espectros de absorción al UV de los OE más comunes; en esta figura se observa que el 7-CC presenta un máximo de absorción aproximadamente 3 veces superior al resto de OE, con lo cual no existen problemas de detección para este compuesto. En cambio, la detección por este sistema es más problemática para el resto de OE e imposible para el CT y los colesterol epóxidos. Este problema se ha intentado solucionar mediante una derivatización de los OE, consistente en la esterificación de sus grupos hidroxilo con grupos benzoato o dinitrobenzoato. Con esta esterificación se consigue un aumento de la absorción en la zona UV. Los derivados benzoilados presentan su máximo de absorción a 230 nm, mientras que los dinitrobenzoilados lo presentan a 254 nm. El agente derivatizante empleado es, respectivamente, cloruro de benzoilo y cloruro de dinitrobenzoilo. La utilización de estos sistemas de derivatización arranca de los años 70 (Carey y Persinger, 1972; Fitzpatrick y Siggia, 1973), pero recientemente han sido revisados en un trabajo de Fillion y Zee (1991), en el cual se concluye que la benzoilación es más útil que la dinitrobenzoilación. En estas derivatizaciones son factores críticos las condiciones de reacción y la estabilidad de los derivados, que son fácilmente hidrolizables. Fillion y Zee en su trabajo dan condiciones de benzoilación en las que se obtiene un máximo rendimiento de la reacción y una estabilidad de los derivados durante dos días. Las ventajas de estas derivatizaciones son: la detección del CT y epóxidos de colesterol; el aumento de la sensibilidad en general; y la utilización de una única longitud de onda para la detección de todos los analitos. A pesar de todas estas ventajas, estas derivatizaciones han sido poco empleadas en la determinación de OE, ya que la reacción de derivatización introduce alta variabilidad y los compuestos resultantes son fácilmente hidrolizables.

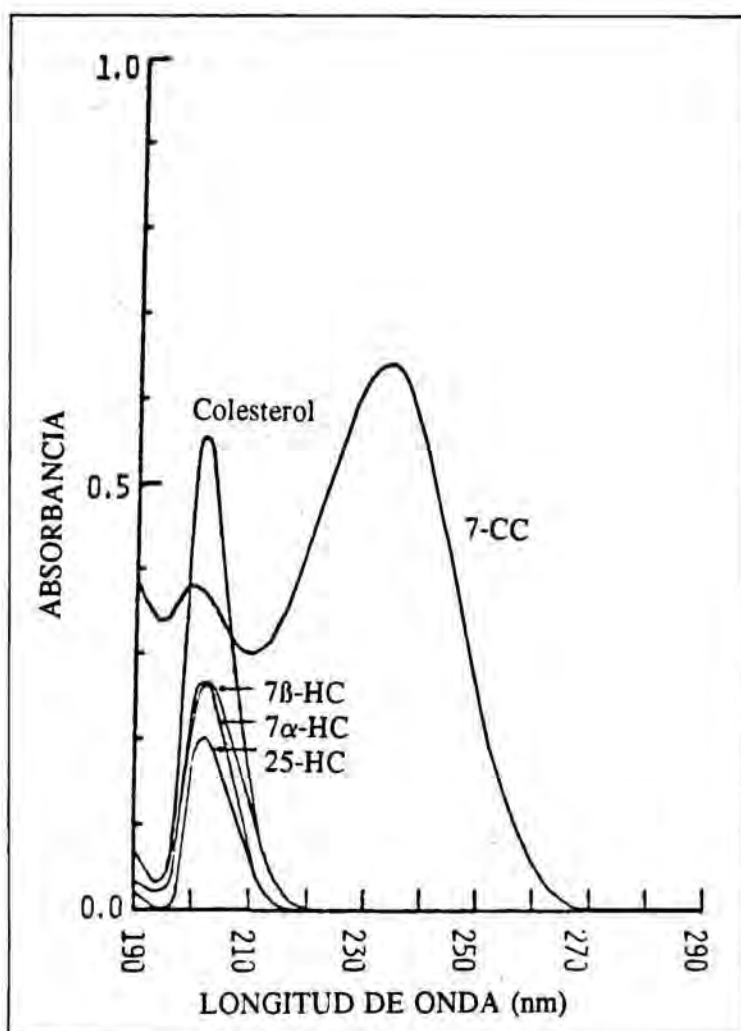


Figura 4-Espectros de absorción al UV de los OE más comunes (Csallany et al., 1989).

Por otro lado, otro de los sistemas de detección ampliamente utilizado en el análisis de OE por CLAE es el refractométrico (tabla 2). La ventaja de este sistema es que es universal, pero su desventaja es que presenta baja sensibilidad. En algunos trabajos, este sistema se utiliza combinado con el espectrofotómetro para detectar los OE que no presentan absorción al UV (Finocchiaro et al., 1984; Tsai y Hudson, 1981).

Además de estos dos sistemas de detección también se han utilizado como detectores el de EM (Park y Addis, 1992) y, bastante recientemente, el DIL (Maerker et al., 1988).

La identificación de estos compuestos mediante CLAE se efectúa de forma idéntica a como se realiza en la CG, mediante TR y cocrromatografía. En ciertas ocasiones la identificación se comprueba por CCF con gel de sílice. Una vez realizada la identificación se puede pasar a la cuantificación, pero teniendo en cuenta que es prácticamente indispensable confirmar la identificación mediante espectrometría de masas.

4.2.3. CUANTIFICACIÓN

Un requisito indispensable para la cuantificación por CLAE es la linealidad frente al detector. El método de cuantificación más utilizado es el del patrón externo (tabla 2). En caso de utilizar como detector el espectrofotómetro UV no se puede emplear un único patrón como patrón externo, ya que los OE responden de forma diferente frente a este detector. Por otro lado, en un trabajo de Park y Addis (1987) se utilizó el método del PI. El compuesto utilizado como patrón interno fue la 7-cetopregnenolona.

5. CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

En espectrometría de masas los analitos se pueden introducir en la cámara de ionización de forma directa o bien procedentes de una separación cromatográfica (CG-EM o CLAE-EM). Las moléculas en la cámara de ionización se bombardean con un haz electrónico de alta energía (normalmente 70 eV). Como resultado de este bombardeo una pequeña proporción de las moléculas se ioniza y las moléculas ionizadas pueden permanecer como tales o sufrir una fragmentación dando lugar a iones característicos. Estos iones se separan en el analizador de acuerdo con su relación carga/masa mediante campos magnéticos (sectores magnéticos o sistema de cuatro polos). Los iones separados llegan al multiplicador electrónico y la corriente iónica amplificada es registrada en función de su intensidad. Los iones moleculares (M^+ o M) provienen de la ionización de una molécula del analito por la pérdida de un electrón. Los iones moleculares, por tanto, aparecen a un valor de m/z igual al peso molecular del analito correspondiente. El pico más intenso del espectro de masas constituye el pico base a partir del cual se normalizan las intensidades del resto de iones.

La espectrometría de masas en el análisis de OE se aplica básicamente para confirmar la

identificación de posibles OE separados por cromatografía. Esto se hace comparando los espectros de masas de estos posibles OE con los de los patrones. La espectrometría de masas cada vez es más importante en este análisis y existen muchos trabajos en los que aparecen los espectros de masas de los OE, ya sea en forma de trimetilsilil (TMS) éteres o bien sin derivatizar (tabla 4). Gracias a esto, se pueden establecer de forma inequívoca los iones característicos de los OE más comúnmente analizados, lo que resulta muy útil como trabajo de referencia.

Ocasionalmente, la espectrometría de masas se ha utilizado en el análisis de OE para elucidar estructuras.

Tabla 4-Referencias bibliográficas en donde aparecen espectros de masas de algunos OE.

Diferentes formas de los OE		
Sin Derivatizar	Derivatizados en forma de Trimetilsilil éteres	Combinaciones de OE con otras moléculas
Cleveland y Harris, 1987	Aringer y Eneroth, 1974	Pannecoucke <i>et al.</i> , 1992
De Vore, 1988	Brooks <i>et al.</i> , 1968, 1973	
Finocchiaro <i>et al.</i> , 1984	Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987, 1989	
Gray <i>et al.</i> , 1971	Park y Addis, 1985a, 1986a, 1987, 1989, 1992	
Park y Addis, 1985b, 1992	Zhang <i>et al.</i> , 1991	
Tsai y Hudson, 1984		

5.1.IONES CARACTERÍSTICOS DE LOS OXIESTEROLES EN FORMA DE TRIMETILSILIL ÉTERES.

Los OE por CG comúnmente se analizan en forma de trimetilsilil éteres y por tanto sus espectros de masas en esta forma son relativamente conocidos.

TMS éteres de los 7-hidroxicolesteroles: La diferenciación de estos dos epímeros es básicamente cromatográfica, ya que sus espectros de masas son prácticamente idénticos. Estos dos compuestos presentan unos espectros bastante sencillos en donde el pico más intenso posee m/z 456 (M-90) y otros picos característicos poco intensos son: 546 (M), 441 (M-90-15), 366 (M-180) y 351 (M-180-15) (figura 5). En cambio, otros hidroxicolesteroles como el 4 β -HC dan lugar a espectros mucho más complicados. El 4 β -HC presenta los siguientes picos característicos con una intensidad notable: 541 (M), 456 (M-90), 417 y 366 (M-180). Además también presenta otro pico intenso que es el 129, pico característico de todos los esteroides con un doble enlace en la posición 5 (Dumazer *et al.*, 1986).

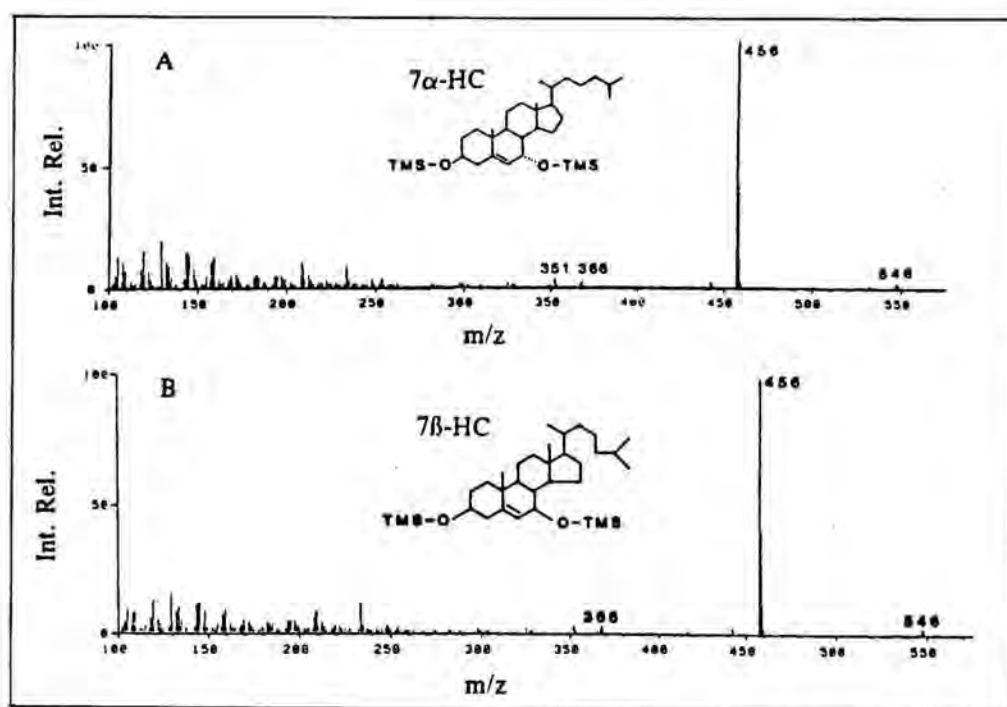


Figura 5-Espectros de masas de los 7-HCs en forma de TMS éteres.
 (A) 7 α -HC (Park y Addis, 1987). (B) 7 β -HC (Park y Addis, 1986a).

TMS éteres de hidroxicolesteroles con grupo hidroxilo en la cadena lateral: El más importante de estos OE es el 25-HC que presenta el pico base a m/z 131 y otros picos característicos menos intensos a 546 (M), 531 (M-15), 456 (M-90), 441 (M-90-15), 366 (M-180), 351 (M-180-15), 327 y 271 (figura 6). Algunos de estos últimos picos no se aparecen

en todos los trabajos revisados. El espectro de masas del 20-HC presenta el pico base a m/z 201 y otro pico característico a m/z 461 (M-85).

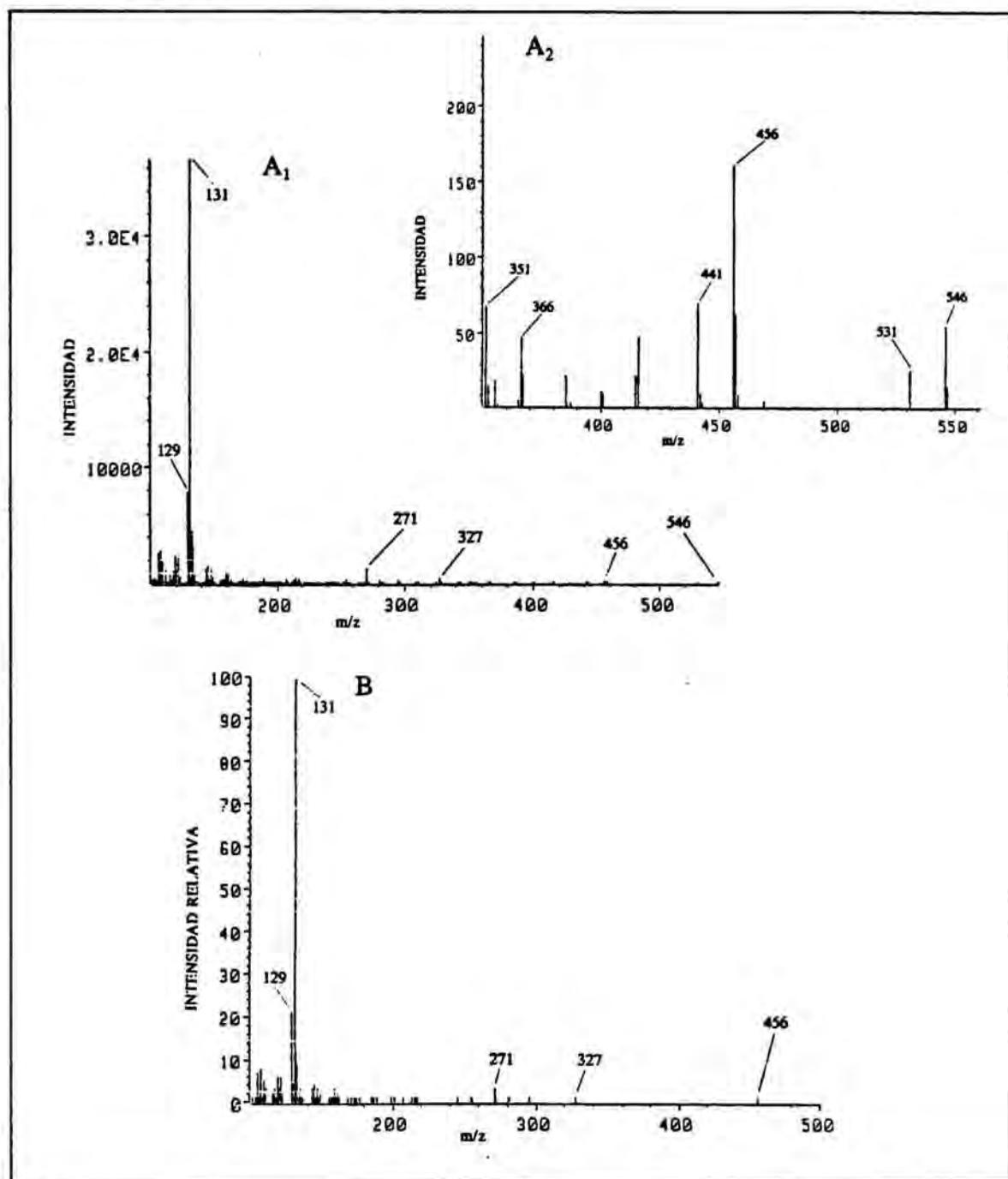


Figura 6-Espectro de masas del 25-HC en forma de TMS éter. (A₁) Sin normalizar. (A₂) Zona final ampliada. (B) Normalizado (apartado IV.B.2.6.1., página 253).

TMS éteres de los colesterol epóxidos: Los iones más característicos de estos dos epímeros son los presentes a 474 (M) y a 384 (M-90). Los espectros de estos compuestos son muy parecidos pero existen algunas diferencias entre ellos. No obstante, estas diferencias son

ampliamente controvertidas. Los picos a m/z 366 y 369 (M-90-15) han sido observados en el α -CE; en cambio, en el β -CE Park y Addis (1986a) sólo observaron el pico a 369, mientras que otros autores también observaron el pico a 366 (Aringer y Eneroth, 1974; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987). Por otro lado, los iones a m/z 459 (M-15) y 456 también son característicos de estos dos epímeros (figura 7). Esta controversia no tiene mayor importancia, ya que estos picos se diferencian cromatográficamente, de forma clara.

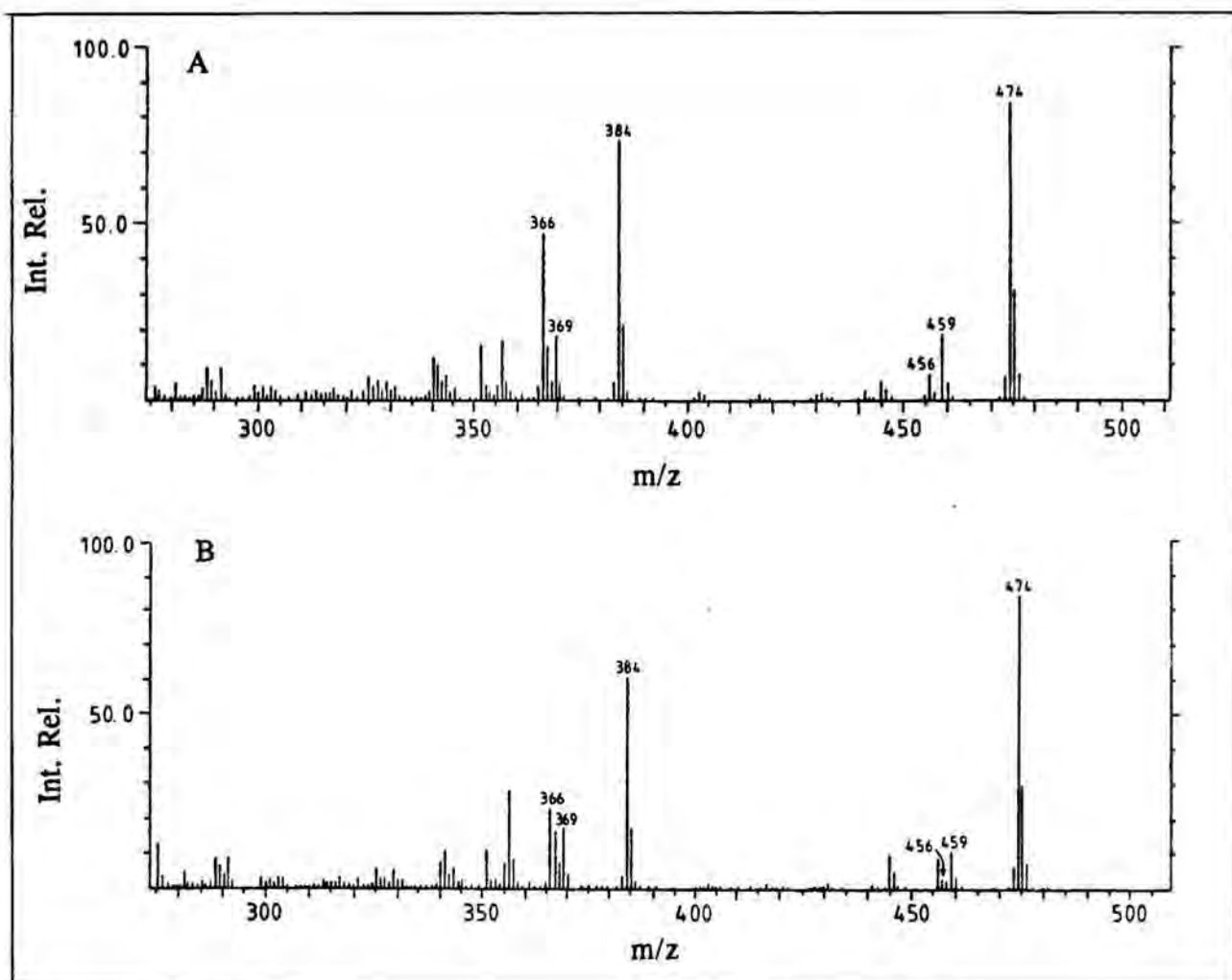


Figura 7-Espectros de masas de los colesterol epóxidos en forma de TMS éteres.

(A) α -CE. (B) β -CE (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987).

TMS éteres del 7-cetocolesterol: En algunos trabajos el ion molecular de este compuesto (m/z 472) fue el pico base. Otros dos picos a m/z 382 (M-90) y 367 (M-90-15) presentan

intensidades considerables. Además, existen otros iones característicos no citados en todos los trabajos como son: 457 (M-15), 187, 174 y 161 (figura 8). Es importante mencionar que el pico base del espectro se encuentra a m/z 472 cuando se utilizan sectores magnéticos (Park y Addis, 1985a; Brooks *et al.* 1968) y a m/z 129 cuando se utiliza el sistema de los cuatro polos (cuadropolo) (Park y Addis 1986a, apartado IV.B.2.6.1., página 252).

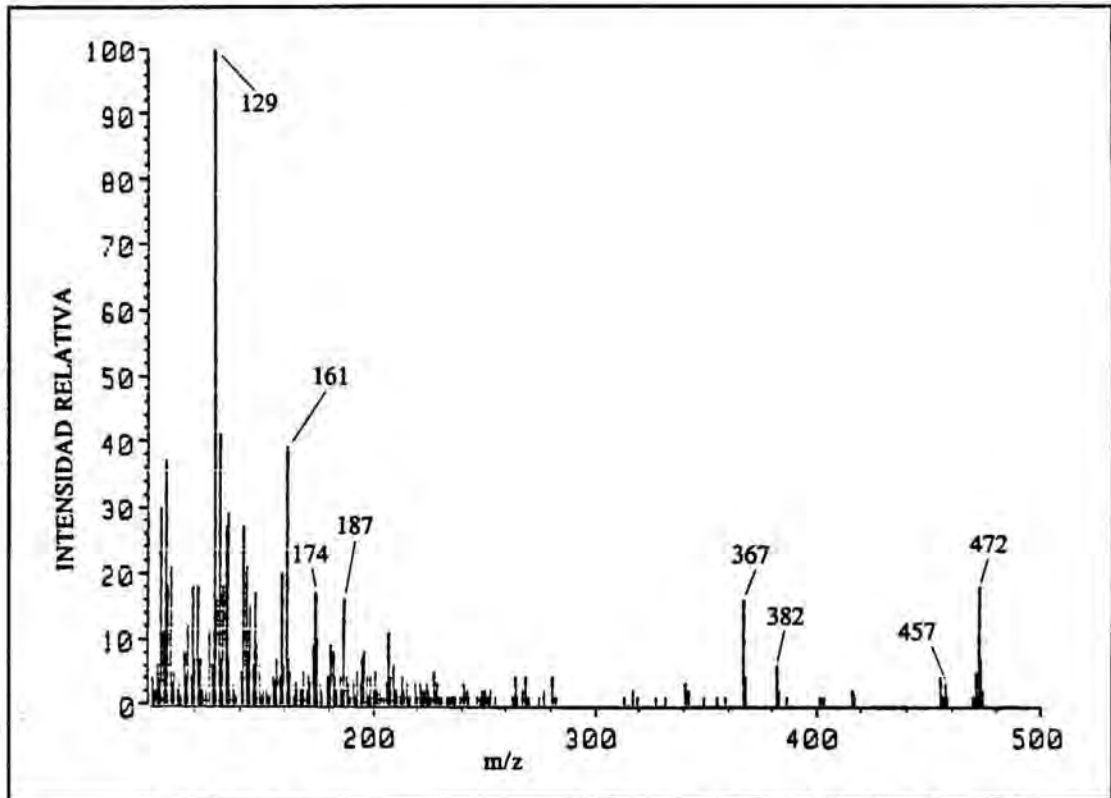


Figura 8-Espectro de masas del 7-CC en forma de TMS éster (apartado IV.B.2.6.1., página 252).

TMS éter del CT: El CT presenta tres grupos hidroxilo. Una completa trimetilsilil eterificación de los tres grupos hidroxilo se consiguió calentando a 60 °C durante 60 hr con una mezcla de BSA/TMCS/TMSI (3:2:3) (Brooks *et al.*, 1968). Cuando la derivatización se realizó a temperatura ambiente durante 1 hr se formó el bis-TMS éter en lugar del tris-TMS éter, siendo el hidroxilo no silanizado el de la posición 5 α , que es el más estéricamente impedido. Los espectros de masas de estos dos derivados fueron muy parecidos. No obstante, el pico base para el bis-TMS se situó a m/z 129 mientras que para el tris-TMS lo hizo a 456 (Brooks *et al.*, 1973). Más recientemente, Park y Addis (1989) reincidieron sobre el tema en un estudio en donde se comprobó que, cuando la derivatización se realizaba con

BSA/TMCS/TMSI (3:2:3) a 70 °C por un largo período de tiempo, a expensas del pico de bis-TMS iba apareciendo un nuevo pico de tris-TMS (figura 9). Estos dos picos perfectamente diferenciados de forma cromatográfica presentaron espectros de masas muy parecidos. No obstante, en el espectro de masas del tris-TMS aparecen dos picos a m/z 636 (M) y 621 (M-15) no presentes en el espectro de masas del bis-TMS, en donde, en cambio, aparece un pico exclusivo de él a m/z 564 (M) (figura 10). Así, mediante estos tres picos se diferencian de forma clara estos dos derivados del CT. Por otro lado, existen una serie de picos comunes a ambos compuestos que se sitúan a m/z : 546, 531, 456, 441, 403, 367 y 321. En algunos trabajos se detecta un pico a m/z 351 (Park y Addis 1987, apartado IV.B.2.6.1., página 251).

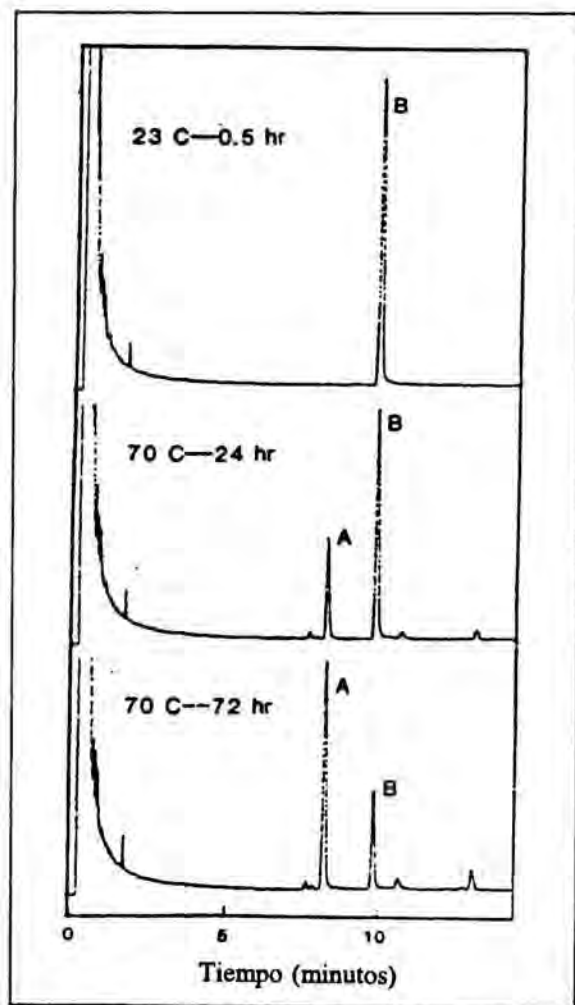


Figura 9-Cromatogramas de los trimetilsil éteres del CT derivatizado bajo diferentes condiciones. (A) tris-TMS. (B) bis-TMS. (Park y Addis, 1989).

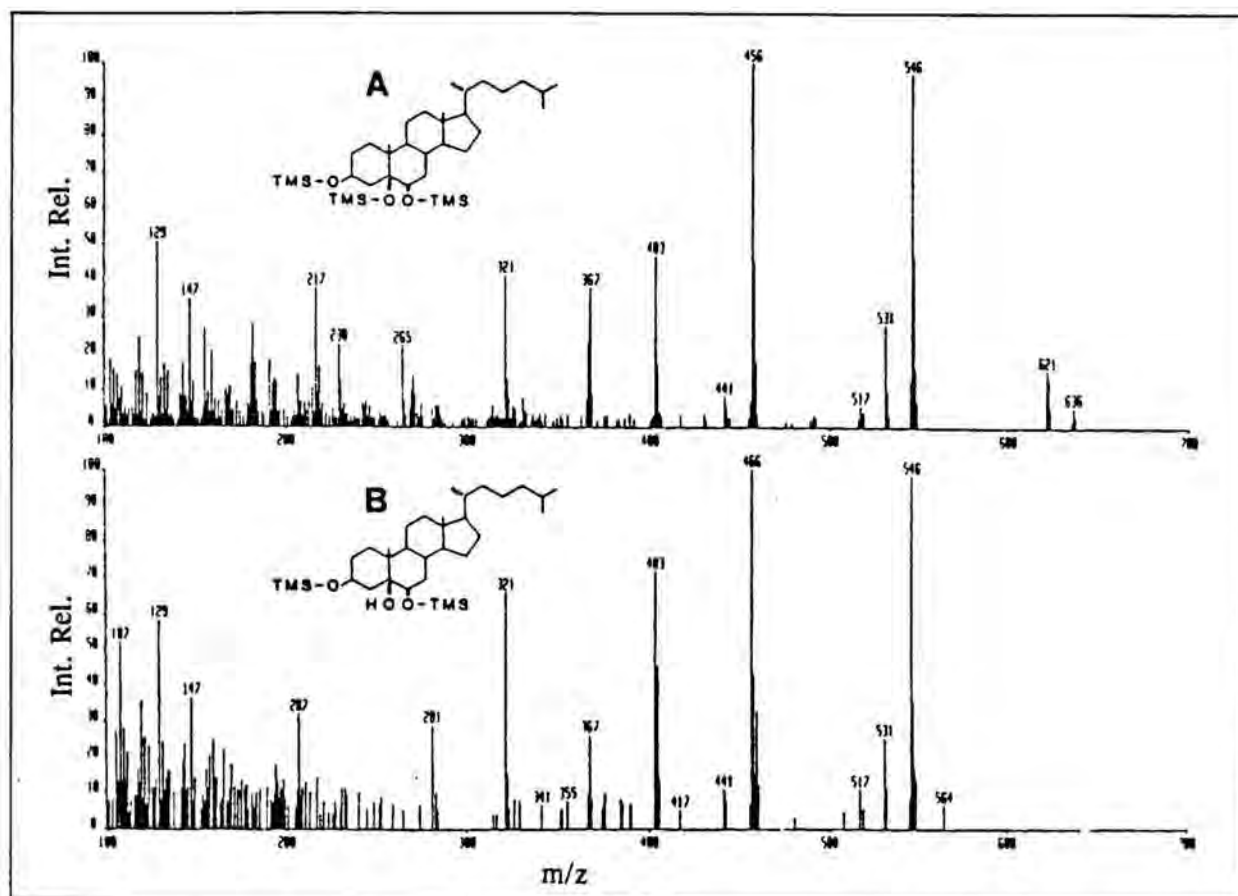


Figura 10-Espectros de masas de los trimetilsilil éteres del CT. (A) tris-TMS. (B) bis-TMS. (Park y Addis, 1989).

5.2.IONES CARACTERÍSTICOS DE LOS OXIESTEROLES SIN DERIVATIZAR.

El análisis de OE por CLAE se realiza normalmente sin derivatización previa. Para la identificación de estos compuestos se puede utilizar la introducción directa del analito puro, procedente de la elución de la muestra por CLAE, en la cámara de ionización del espectrómetro de masas o, en contadas ocasiones, la CLAE acoplada directamente a la EM.

7-HCs: Ambos epímeros presentan espectros de masas muy parecidos con el pico base situado a m/z 384 (M-18). Otros picos característicos son: 402(M), 366 (M-18-18), 351 (M-18-18-15) y 247 (M-42-cadena lateral) (figura 12).

25-HC: Para este compuesto Kou y Holmes (1985) observaron los siguientes iones característicos a m/z : 402 (M), 384 (M-18) y 369 (M-18-15).

Colesterol epóxidos: Los espectros de estos dos epímeros son bastante parecidos y presentan sus picos característicos a m/z 402 (M), 384 (M-18), 369 (M-18-15), 271 (M-18-cadena lateral), 247 (M-42-cadena lateral) y 229 (M-18-42-cadena lateral). No obstante, Tsai y Hudson (1984) observaron que a m/z 331 aparece un pico en el espectro del α -CE que no lo hace en el del β -CE y además que el α -CE presenta a 356 un pico mucho más intenso que el que presenta el β -CE (figura 11).

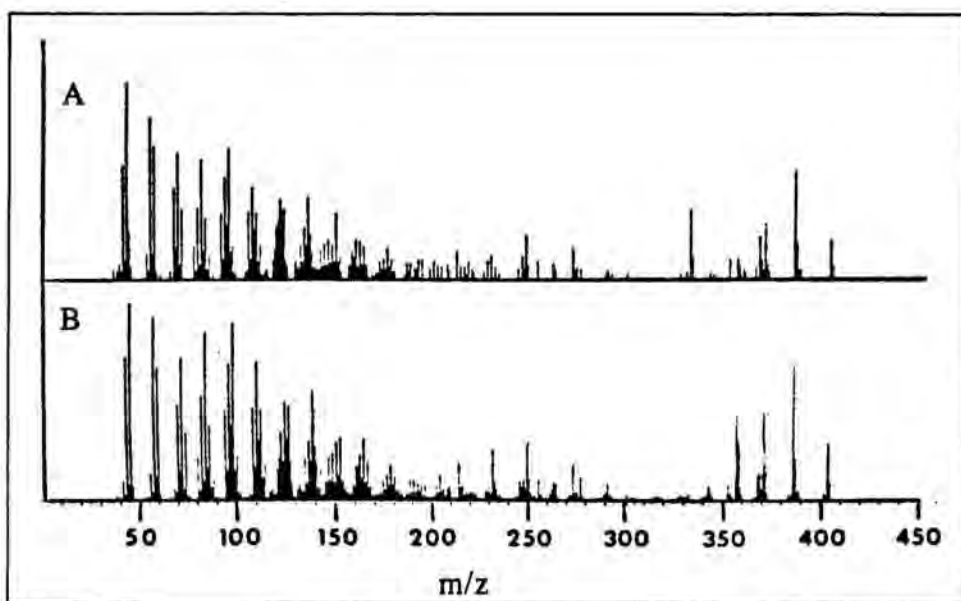


Figura 11-Espectros de masas de los CEs. (A) α -CE. (B) β -CE (Tsai y Hudson, 1984).

7-CC: El pico base se sitúa a m/z 400 (M), otros picos observados en el espectro de masas se encuentran a m/z 382 (M-18), 367 (M-18-15), 287 (M-cadena lateral), 205, 192 y 174 (De Vore, 1988; Park y Addis, 1985b) (figura 12).

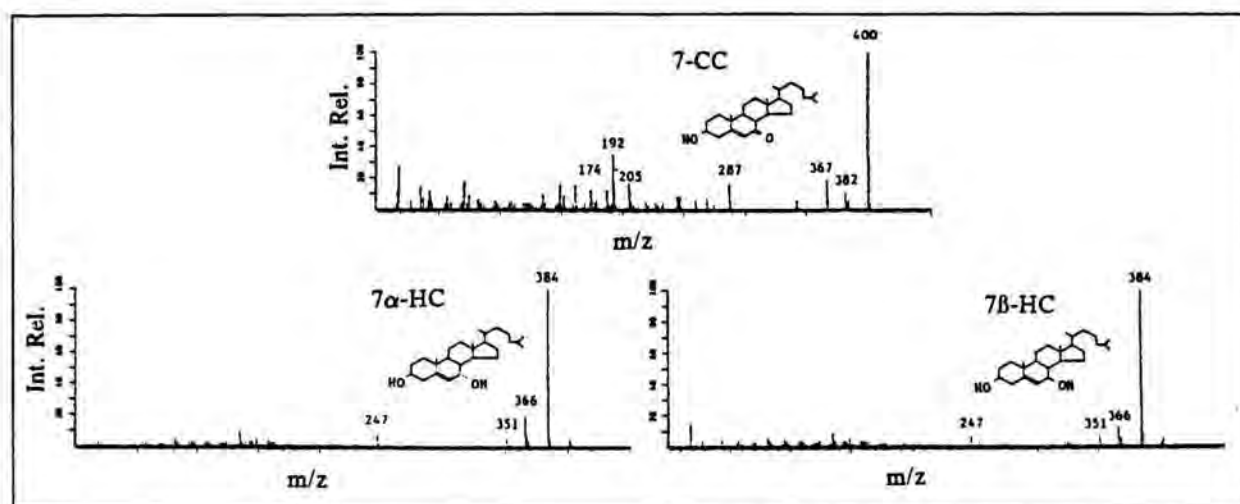


Figura 12-Espectros de masas de los C-7 OE sin derivatizar (Park y Addis, 1985b).

CT: Para este compuesto Finocchiaro *et al.* (1984) observaron los siguientes iones característicos a m/z : 420 (M), 402 (M-18), 387 (M-18-15), 366 (M-18-18), 351 (M-18-18-15), 271 (M-18-cadena lateral), 247 (M-42-cadena lateral) y 229 (M-18-42-cadena lateral).

5.3.MONITORIZACIÓN DE IONES SELECCIONADOS.

Es la técnica conocida en inglés por las siglas SIM (Selected Ion Monitoring). Esta técnica tiene aplicaciones cuantitativas y cualitativas, consiste en elegir de cada OE un sólo ion característico en el caso de la cuantificación o varios en el caso de la identificación. De esta manera sólo llegan al multiplicador los iones escogidos y se obtiene una sensibilidad y selectividad mucho mayores. Los iones elegidos deben ser cuanto más intensos mejor. En el caso de la identificación se suelen escoger varios iones pero cuantos más iones se escogen menos sensible es la técnica. La cuantificación mediante esta técnica se realiza utilizando patrones internos.

6.BIBLIOGRAFÍA.

Acker, L. y Greve, H. (1963). Uber die Photoxydation des Cholesterins in Eihaltigen Lebensmitteln. *Fette Seif. Anstrich.* **65**, 1009-1012.

Addis, P.B., Emanuel, H.A., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1989). Capillary GC quantification of cholesterol oxidation products in plasma lipoproteins of fasted humans. *Free Radical Biol. Med.* **7**, 179-182.

AOAC. (1975). *Official methods of analysis of AOAC*. p. 500. AOAC Inc., Whashington, DC., EUA.

Aringer, L. y Eneroth, P. (1974). Formation and metabolism in vitro of 5,6-epoxides of cholesterol and B-sitosterol. *J. Lipid. Res.* **15**, 389-398.

Bascoul, J., Domergue, N., Olle, M. y Crastes de Paulet, A. (1986). Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids* **21**, 383-387.

Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1941). Autoxydation of sterols in colloidal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol. *J. Biol. Chem.* **141**, 597-610.

Bischoff, F. (1969). Carcinogenic effect of steroids. En *Advances in lipid research*. (R. Paoletti y D. Kritchevsky, Ed.), p. 165. Academic Press, Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.

Brooks, C.J.W., Henderson, W. y Steel, G. (1973). The use of trimethylsilyl ethers in the characterization of natural sterols and steroid diols by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.* **296**, 431-445.

Brooks, C.J.W., Horning, E.C. y Young, J.S. (1968). Characterization of sterols by gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl ethers. *Lipids*. **3**, 391-402.

Carey, M.A. y Persinger, H.E. (1972). Liquid chromatographic determination of traces of aliphatic carbonyl compounds and glycols as derivatives that contain the dinitrophenyl group. *J. Chromatogr. Sci.* **10**, 537-543.

Cleveland, M. Z. y Harris, N.D. (1987). Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. *J. Food Prot.* **50**, 867-871.

Csallany, A. S., Kindom, S. E., Addis, P. B. y Lee, J-H. (1989). HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. *Lipids* **24**, 645-651.

Csiky, I. (1982). Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by absorption high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **24**, 381-389.

Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968a). Photoxidation of cholesterol in spray-dried egg yolk upon irradiation. *J. Food Sci.* **3**, 581-587.

- Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968b). Isolation and characterization of cholesterol-5 β ,6 β -oxide from an aerated aqueous dispersion of cholesterol. *Lipids* **3**, 335-339.
- Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968c). Synthesis, purification and characterization of 7-ketocholesterol and epimeric 7-hydroxycholesterols. *Lipids* **3**, 551-556.
- De Vore, V.R. (1988). TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef. *J. Food Sci.* **53**, 1058-1061.
- Doormaal, J.J., Smit, N., Koopman, B.J., Van Der Molen, J.C., Wolthers, B.G. y Doorenbos, H. (1989). Hydroxycholesterols in serum from hypercholesterolaemic patients with and without bile acid sequestrant therapy. *Clin. Chim. Acta.* **181**, 273.
- Dumazer, M., Farines, M. y Soulier, J. (1986). Identification de stérols par spectrométrie de masse. *Rev. Fr. Corps Gras* **33**, 151-156.
- Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1991). Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.* **56**, 843-847.
- Fillion, L., Zee, J.A. y Gosselin, C. (1991). Determination of a cholesterol oxide mixture by a single-run high-performance liquid chromatographic analysis using benzoylation. *J. Chromatogr.* **547**, 105-112.
- Finocchiaro, E.T., Lee, K. y Richardson, T. (1984). Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 877-883.
- Fitzpatrick, F.A. y Siggia, S. (1973) High resolution liquid chromatography of derivatized non-ultraviolet absorbing hydroxy steroids. *Anal. Chem.* **45**, 2310-2314.
- Flanagan, V.P., Ferretti, A., Schwartz, D.P. y Ruth, J.M. (1975). Characterization of two steroid ketones and two isoprenoid alcohols in dairy products. *J. Lipid. Res.* **16**, 97-101.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Fontana, A., Antoniazzi, F., Cimino, G., Mazza, G., Trivellone, E. y Zanone, B. (1992). High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J. Food Sci.* **57**, 869-879.
- Gray, M.F., Lawrie, T.D.V. y Brooks, C.J.W. (1971). Isolation and identification of cholesterol α -oxide and other minor sterols in human serum. *Lipids* **6**, 836.

Gruenke, L.D., Graig, J.C., Petrakis, N.L. y Lyon, M.B. (1987). Analysis of cholesterol, cholesterol-5,6-epoxides and cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol in nipple aspirates of human breast fluid by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **14**, 335-338.

Herian, A.M. y Lee, K. (1985). 7 α - and 7 β -hydroxycholesterols formed in a dry egg nog mix exposed to fluorescent light. *J. Food Sci.* **50**, 276-277.

Higley, N.A., Taylor, S.L., Herian, A.M. y Lee, K. (1986b). Cholesterol oxides in processed meats. *Meat Sci.* **16**, 175-188.

Hubbard, W.D., Sheppard, A.J., Newkirk, D.R., Prosser, A.R. y Osgood, T. (1977). Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterols from food products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**, 81-83.

Hwang, K.T. y Maerker, G. (1993). Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 371-375.

Ibrahim, N., Unklesbay, N., Kapila, S. y Puri, R.K. (1990). Cholesterol content of restructured pork/soy hull mixture. *J. Food Sci.* **55**, 1488-1490.

Itoh, T., Tamura, T. y Masumoto, T. (1973). Methylsterol compositions of 19 vegetable oils. *J. Amer. Oil Chem Soc.* **50**, 300.

Jacobson, M.S. (1987). Cholesterol oxides in indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in indian immigrant populations. *Lancet Septiembre 19*, 656-658.

Kaneda, T., Nakajima, A., Fujimoto, K., Kobayashi, T., Kiriya, S., Ebihara, K., Inmami, T., Tsuji, K., Tsuji, E., Kinumaki, T., Shimma, H. y Yoneyama, S. (1980). Quantitative analysis of cholesterol in foods by gas-liquid chromatography. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **26**, 497-505.

Koopman, B.J., Van Der Molen, J.C. y Wolthers, B.G. (1987). Determination of some hydroxycholesterols in human serum samples. *J. Chromatogr.* **416**, 1-13.

Korahani, V., Bascoul, J. y Crastes de Paulet A. (1981). Capillary column gas-liquid chromatographic analysis of cholesterol derivatives. Application to the autoxidation products of cholesterol. *J. Chromatogr.* **211**, 392-397.

Kou., I.L. y Holmes, R.P. (1985). The analysis of 25-hydroxycholesterol in plasma and cholesterol containing foods by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **330**, 339-346.

Lee, K., Herian, A.M. y Higley, A. (1985). Sterol oxidation products in french fries and in stored potato chips. *J. Food Prot.* **48**, 158-161.

- Luby, J.M., Gray, J.I., Harte, B.R. y Ryan, T.C. (1986). Photooxidation of cholesterol in butter. *J. Food Sci.* **51**, 904-923.
- Maerker, G. y Jones, K.C. (1992). Gamma-irradiation of individual cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 451-455.
- Maerker, G., Nungesser, E.H. y Zulak, I.M. (1988). HPLC separation and quantitation of cholesterol oxidation products with flame ionization detection. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 61-63.
- Maerker, G. y Unruh, J. (1986). Cholesterol oxides. 1. Isolation and determination of some cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 767-773.
- Missler, S.R., Wasilchuk, B.A. y Merritt, C. (1985). Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. *J. Food Sci.* **50**, 595-598, 646.
- Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1987). Formation of cholesterol-5,6-epoxides during Spray-drying of egg yolk. *J. Food Sci.* **52**, 1224-1227.
- Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1989). Wide-bore capillary gas chromatographic method for quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder. *J. Food Sci.* **54**, 427-429, 457.
- Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1992). Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *J. Food Sci.* **57**, 43-45, 107.
- Naber, E.C., Allred, J.B., Winget, J. y Stock, A.E. (1985). Effect of cholesterol oxidation products on cholesterol metabolism in laying hen. *Poult. Sci.* **64**, 675-680.
- Naber, E.C. y Biggert, M.D. (1985). Analysis for and generation of cholesterol oxidation products in egg yolk by heat treatment. *Poult. Sci.* **64**, 341-347.
- Nawar, W.W., Kim, S.K., Li, Y.J. y Vadjji, M. (1991). Measurement of oxidative interactions of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 496-498.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1987). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* **52**, 57-62, 67.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988a). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Butter and cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1635-1641.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988b). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Milk powder products. *J. Food Sci.* **53**, 74-79, 87.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1989). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Lard and bacon. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 586-592.

- Pannecoucke, X., Van Dorsselaer, A. y Luu B. (1992). Mass spectrometric studies of phosphodiester linked to oxysterols and nucleosids, a family of biologically potent oxygenated sterols. *Organic Mass Spectrometry* **27**, 140-144.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1985a). Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. *Anal. Biochem.* **149**, 275-283.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1985b). HPLC determination of C-7 oxidized Cholesterol derivatives in foods. *J. Food Sci.* **50**, 1437-1441, 1444.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986a). Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 653-659.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986b). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J. Food Sci.* **51**, 1380-1381.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1987). Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *J. Food Sci.* **52**, 1500-1503.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1989). Derivatization of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol into trimethylsilyl ether sterol for GC analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 1632-1634.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1992). Methods of analysis of cholesterol oxides. En *Biological effects of cholesterol oxides* (S.K. Peng y R.J. Morin, Ed.). p.33-70. CRC Press, Boca Raton-Ann Arbor-Londres.
- Parks, O.W., Schwartz, D.P., Keeney, M. y Damico, J.N. (1966). Isolation of Cholest-7-en-3-one from butterfat. *Nature.* **210**, 416-417.
- Pennock, H.F., Neiss, G. y Mahler, H.R. (1962). Biochemical studies on the developing avian embryo. *Biochem. J.* **85**, 530-537.
- Pie, J.E. y Seillan, C. (1992). Oxysterols in cultured bovine aortic smooth muscle cells and in the monocyte-like cell line. *Lipids* **27**, 270-274.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1990). Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: Identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 973-979.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1991). Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 250-254.
- Prasad, C.R. y Subramanian, R. (1992). Qualitative and comparative studies of cholesterol oxides in commercial and home-made indian ghees. *Food Chem.* **45**, 71-73.
- Ryan, T.C., Gray, J.I. y Morton, I.D. (1981). Oxidation of cholesterol in heated tallow. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 305-308.

- Sander, B.D., Smith, D.E. y Addis, P.B. (1988). Effectes of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **71**, 3173-3178.
- Sander, B.D., Smith, D.E., Addis, P.B. y Park, S.W. (1989). Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. *J. Food Sci.* **54**, 874-879.
- Teng, J.I. (1990). Oxysterol separation by HPLC in combination with thin layer chromatography. *Chromatogram* November 1990, 8-10.
- Teng, J.I. (1991). Column variations in the analysis of oxysterols using normal-phase high performance liquid chromatography. *LC-GC Intl.* **4**, 34-36.
- Teng, J.I., Kulig, M.J. y Smith, L.L. (1973). Sterol metabolism. XXII. Gas chromatographic differentiation among cholesterol hydroperoxides. *J. Chromatogr.* **75**, 108-113.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1981). High performance liquid chromatography of oxygenated cholesterols and related compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 931-934.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1984). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Isolation and identification. *J. Food Sci.* **49**, 1245-1248.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *J. Food Sci.* **50**, 229-231, 237.
- Tsai, L.S., Ijichi, K., Hudson, C.A. y Meehan, J.J. (1980). A method for the quantitative estimation of cholesterol α -oxide in eggs. *Lipids* **15**, 124-128.
- Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-schuil, T.G. y Katan, M.B. (1988). Quantification of oxysterols in dutch foods: Egg products and mixed diets. *Lipids* **23**, 1079-1085.
- Van Lier, J.E. y Smith, L.L. (1968). Sterol metabolism II. Gas chromatographic recognition of cholesterol metabolites and artifacts. *Anal. Biochem.* **24**, 419-430.
- Yan, P.S. y White, P.J. (1990). Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 927-931.
- Zhang, W.B. y Addis, P.B. (1990). Prediction of levels of cholesterol oxides in heated tallow by dielectric measurement. *J. Food Sci.* **55**, 1673-1675.
- Zhang, W.B., Addis, P.B. y Krick, T.P. (1991). Quantification of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol and other cholesterol oxidation products in fast food french fried potatoes. *J. Food Sci.* **56**, 716-718.
- Zubillaga, M.P. y Maerker, G. (1991). Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. *J. Food Sci.* **56**, 1194-1202.

III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.

La revisión bibliográfica realizada sobre contenidos de OE en alimentos, sus mecanismos de formación, sus efectos biológicos y la metodología aplicable para su determinación, condujo al establecimiento de una serie de objetivos experimentales, tomando como modelo de estudio el huevo. La elección del huevo vino justificada por las características de composición del producto, en especial la elevada densidad de colesterol de este alimento y por su alto contenido en ácidos grasos polinsaturados, que lo hacen especialmente sensible a la oxidación, y también por la tecnología aplicada en la obtención de ovoproductos, que implica la utilización de temperaturas elevadas.

Los objetivos propuestos fueron los que se detallan a continuación y, como puede verse en la figura 1, constituyen en su conjunto la base necesaria para el desarrollo global de este trabajo.

- 1)** Estudio de la composición lipídica (ácidos grasos y colesterol) del huevo fresco, como punto de referencia de los procesos de alteración oxidativa.
- 2)** Discusión de la metodología analítica existente, estudio comparativo y elección de un método para la determinación de OE.
- 3)** Establecimiento de contenidos de OE en huevos y ovoproductos.
- 4)** Estudio de la formación de OE durante los procesos de obtención de huevo en polvo por atomización.
- 5)** Estudio de la formación de OE durante el almacenamiento de huevo en polvo.
- 6)** Estudio de las relaciones entre la formación de OE en huevo en polvo y ciertos parámetros de alteración (parámetros de oxidación lipídica y relacionados con la reacción de Maillard).

OBJETIVOS	DESARROLLO
<p>Conocimiento previo de la composición en ácidos grasos y colesterol del huevo fresco, como punto de referencia de la alteración oxidativa.</p>	<p>Estudio de la composición en ácidos grasos del huevo fresco.</p> <p>Estudio del contenido de colesterol en huevo fresco.</p>
<p>OBJETIVO GLOBAL DE LA TESIS.</p>	<p>ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE OXISTEROLES EN EL HUEVO EN POLVO DURANTE EL PROCESO DE ATOMIZACIÓN Y EL ALMACENAMIENTO.</p>
<p>Estudio de la metodología analítica para la determinación de oxisteroles.</p>	<p>Revisión de la metodología existente para la determinación de oxisteroles. Estudio comparativo de tres métodos analíticos y elección del método más fiable.</p>
<p>Estudio de los contenidos de oxisteroles en huevos y ovoproductos.</p>	<p>Establecimiento de los contenidos de oxisteroles en huevo y ovoproductos.</p>
<p>Estudio de la formación de oxisteroles en huevo en polvo y su correlación con otros parámetros de alteración.</p>	<p>Estudio de la formación de oxisteroles durante el proceso de atomización.</p> <p>Estudio de la formación de oxisteroles durante el almacenamiento.</p> <p>Estudio de las correlaciones entre la formación de oxisteroles y otros parámetros de alteración.</p>

Figura 1-Objetivos y desarrollo del trabajo.

Para la consecución de los objetivos propuestos, el trabajo se ha estructurado a partir de cuatro apartados que incluyen diversas experiencias relacionadas con los siguientes aspectos:

A - Estudio de la composición lipídica del huevo fresco (ácidos grasos y colesterol). Este apartado incluye tanto para la determinación de ácidos grasos como para la del colesterol, una discusión de las metodologías existentes y de los resultados referidos en la bibliografía. Es necesario señalar que un análisis profundo de estos aspectos revela la existencia de una gran variabilidad de resultados, debido especialmente a la aplicación de metodologías diversas, situación que exige una validación previa y una aplicación específica en cada caso. Este hecho es especialmente relevante en el caso del contenido de colesterol y de ciertos ácidos grasos polinsaturados, datos de gran importancia para nuestro estudio.

B - Puesta a punto de un método para la determinación de OE en huevo y ovoproductos. Este capítulo incluye un estudio comparativo de tres métodos analíticos a partir de sus parámetros de caracterización. Finalmente, se propuso un método del cual se estudiaron exhaustivamente cada una de sus etapas. El método se basa en la obtención de un extracto purificado que se analiza por CG, identificándose los compuestos de interés por EM.

C - Contenidos de OE en huevos y ovoproductos. En este apartado se determinan los contenidos de oxiesteroles en huevos y ovoproductos por aplicación del método propuesto, discutiéndose los datos obtenidos y los aportados por diferentes autores sobre este tipo de muestras.

D - Formación de oxiesteroles en huevo en polvo producido por atomización. En este apartado se incluye un estudio de la influencia de la temperatura en la formación de OE, durante el proceso de atomización, realizado en planta piloto, y un segundo estudio de la evolución de los contenidos de oxiesteroles en huevo en polvo durante su almacenamiento, bajo diferentes condiciones de envasado y de adición de antioxidantes. En ambos estudios, se han realizado, además, determinaciones de parámetros indicadores de la calidad relacionados con la oxidación lipídica y con la reacción de Maillard.

En todos los apartados se incluye, junto con la parte experimental, una introducción al tema, la bibliografía relacionada y una discusión de los resultados obtenidos.

IV. PARTE EXPERIMENTAL.

IV.A. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS Y CONTENIDO EN COLESTEROL DEL HUEVO FRESCO.

1. Extracción de grasa en huevo y ovoproductos	153
2. Composición en ácidos grasos del huevo fresco: determinación, variabilidad y valor nutricional.	161
3. Determinación selectiva del colesterol en el huevo por cromatografía de gases.	211

IV.A.1. EXTRACCIÓN DE LA GRASA EN HUEVO Y OVOPRODUCTOS.



Los diferentes sistemas de extracción de la fracción grasa, así como la naturaleza de los disolventes orgánicos empleados en ellos, influyen tanto en el rendimiento de la extracción, como en la composición y calidad de la materia grasa obtenida.

El método propuesto por la AOAC (1990, 925.32) para la extracción de la grasa en huevo y ovoproductos es muy exacto, pero al mismo tiempo bastante agresivo. Consiste en una hidrólisis ácida, en caliente, con HCl concentrado y una posterior extracción de la grasa con una mezcla de éter etílico/éter de petróleo (1:1, v/v). El rendimiento de la extracción se obtiene por pesada, tras la eliminación de los disolventes por medio de un baño maría y, a continuación, mediante una estufa a 100 °C (90 min).

Existen otros sistemas de extracción que prácticamente no producen alteraciones en la fracción lipídica. El más ampliamente utilizado de estos sistemas es la agitación con disolventes. Precisamente Warren *et al.* (1988) utilizaron este sistema de extracción en un diseño experimental en donde estudiaron como influye el tipo de disolvente, la relación disolvente/muestra (v/p) y la temperatura, en la extracción de componentes lipídicos del huevo. Estos autores plantearon un diseño factorial 3 x 2 x 2 en el cual se emplearon respectivamente 3 disolventes (hexano; hexano/isopropanol, 2:1, v/v; y cloroformo/metanol, 2:1, v/v), 2 relaciones disolvente/muestra (4/1 y 5/1) y 2 temperaturas (23 °C y 35 °C). En todos los casos 50 g de yema de huevo en polvo, obtenida por atomización, se sometieron a agitación magnética durante 30 minutos con 150 ml de disolvente. A continuación, se filtró la mezcla y el residuo del papel de filtro se lavó con una (relación 4/1) o dos (relación 5/1) porciones de 50 ml de disolvente. Las conclusiones de este trabajo fueron que el hexano es el disolvente que implica un mayor rendimiento en la extracción de fosfolípidos (FL) y grasa total (GT), mientras que el cloroformo/metanol y el hexano/isopropanol se comportan de forma similar, extrayendo mayor cantidad de colesterol y carotenoides que el hexano. No obstante, el cloroformo/metanol extrae un poco más de colesterol y GT que el hexano/isopropanol y esta última mezcla un poco más de FL y carotenoides (CRT) que la anterior. También se concluyó que, para todos los componentes lipídicos estudiados, el segundo lavado implicaba un aumento de su extracción. En cambio, la temperatura no manifestó influencia, pero si la manifestó la interacción temperatura-disolvente, así el hexano/isopropanol extrajo más GT que el cloroformo/metanol a baja temperatura, mientras

que a alta temperatura ocurría lo contrario.

En el huevo fresco, los triglicéridos (TG), FL y colesterol se hallan íntimamente asociados a lipoproteínas formando una fuerte emulsión y son difícilmente extraíbles mediante disolventes apolares como el hexano (Bergquist, 1977). Esta fue una de las razones por la que en nuestro trabajo se utilizó, para la extracción de lípidos, el método de Folch *et al.* (1957), que emplea la mezcla polar de disolventes cloroformo/metanol (2:1, v/v). No obstante, en el caso del huevo en polvo obtenido por atomización, la extracción con hexano es perfectamente capaz de extraer gran cantidad de estos componentes, pues, la atomización implica la rotura de la emulsión y su liberación de las combinaciones lipoproteicas. El hecho de que en el huevo fresco la fracción lipídica sea más difícilmente extraíble nos llevó a aplicar mayores períodos de agitación cuando se trabajaba con este tipo de muestra y con huevo congelado y liofilizado. Así, el método de Folch *et al.* (1957), en nuestro estudio, sufrió diferentes modificaciones en función del tipo de muestra y de la determinación a realizar posteriormente, pues, algunas de estas determinaciones requieren mayor peso de grasa que otras (tabla 1).

Tabla 1-Pesos, volúmenes de la mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v) y tiempos de agitación magnética empleados para la extracción de la grasa por el método de Folch et al. (1957) en función del tipo de muestra y la determinación a realizar posteriormente.

Determinación	Muestra	Peso de muestra	ml cloroformo/metanol (2:1, v/v)-tiempo de agitación		
			1ª extracción	2ª extracción	lavado del residuo
Extinciones Específicas al UV	Huevo congelado	5.40	15 ml-30'	15 ml-20'	5 ml
	Huevo en polvo	0.80	15 ml-30'	10 ml-10'	5 ml
Ácidos grasos	Huevo fresco y congelado	2.50	15 ml-30'	10 ml-20'	5 ml
	Huevo en polvo	0.50	15 ml-30'	10 ml-10'	5 ml
Colesterol	Huevo fresco y congelado	0.60	15 ml-30'	10 ml-20'	5 ml
	Huevo fresco	4.00	15 ml-30'	10 ml-30'	5 ml
Oxisteroles	Huevo congelado y pasteurizado	4.00	15 ml-30'	10 ml-20'	5 ml
	Huevo en polvo liofilizado	1.00	15 ml-30'	10 ml-20'	5 ml
	Huevo en polvo atomizado	0.65	15 ml-30'	10 ml-10'	5 ml

Además, en la elección del método de Folch *et al.* (1957) también se tuvo en cuenta que Hubbard *et al.* (1977), en un trabajo en donde se ensayaron 7 sistemas de extracción sobre 8 alimentos distintos, entre los cuales se encontraba la yema de huevo, concluyeron que la agitación con cloroformo/metanol (2:1, v/v) era el método más efectivo para extraer GT y esteroides. A la misma conclusión llegaron Kanuda *et al.* (1980) al comparar la eficiencia de varios disolventes orgánicos (benceno, acetona, éter etílico y cloroformo/metanol (2:1, v/v)) para extraer la GT y el colesterol de las almejas.

Según todo esto, la mezcla cloroformo/metanol además de extraer buena parte de la GT de los alimentos presenta gran efectividad para extraer compuestos polares como los esteroides y oxisteroides. Así en nuestro caso, sobre la fracción lipídica obtenida del huevo con este sistema de extracción se pueden analizar los AG, el colesterol y los OE, que son los compuestos de interés en nuestro estudio. De hecho, este método de extracción es el más utilizado para este tipo de determinaciones.

Por otro lado, Abdollahi *et al.* (1993) comprobaron que la agitación con hexano/isopropanol (2:1, v/v) de huevo y huevo en polvo es efectiva para extraer colesterol y AG, pues, los valores para estos compuestos al ser determinados por CG o CLAE, tras la extracción, no difirieron significativamente de sus valores de referencia en las muestras.

En relación con el tema, podemos citar la extracción supercrítica con dióxido de carbono, la cual ha sido utilizada en diversos trabajos para separar el colesterol del huevo líquido y en polvo con el fin de obtener ovoproductos bajos en colesterol. Se ha conseguido extraer hasta un 80-90% del contenido en colesterol del huevo en polvo (Froning, 1991; Froning *et al.*, 1990) y cantidades inferiores al 50 en el caso del huevo líquido (Zeidler *et al.*, 1992).

BIBLIOGRAFÍA.

Abdollahi, A., Rosenholtz, N.S. y Garwin J.L. (1993). Tocopherol micro-extraction method with application to quantitative analysis of lipophilic nutrients. *J. Food Sci.* **58**, 663-666.

AOAC. (1990). *Official methods of analysis of the AOAC* (K. Helrich, Ed.). Vol. 2, p. 780, 854. AOAC Inc., Arlington, Virginia, EUA.

Bergquist, D.H. (1977). Egg dehydration. En *Egg science & technology* (W.J. Stadelmam y O.J. Cotterill, Ed.). p. 197-229. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.

Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.

Froning, G.W. (1991). Isolation and/or removal of egg components and their uses. En *Quality of poultry products. II. Eggs and egg products* (A. Oosterwoud y A.W. de Vries, Ed., procedente del "4th European symposium on the quality of eggs and egg products"). p. 233-241. Spelderholt centre for poultry research and information services, Beekbergen, Holanda.

Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Pierce, M.M., Niemann, L. y Siekman, D.K. (1990). Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci.* **58**, 95-98.

Hubbard, W.D., Sheppard, A.J., Newkirk, D.R., Prosser, A.R. y Osgood, T. (1977). Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterols from food products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**, 81-83.

Kaneda, T., Nakajima, A., Fujimoto, K., Kobayashi, T., Kiriya, S., Ebihara, K., Inmami, T., Tsuji, K., Tsuji, E., Kinumaki, T., Shimma, H. y Yoneyama, S. (1980). Quantitative analysis of cholesterol in foods by gas-liquid chromatography. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **26**, 497-505.

Warren, M.W., Brown, G.H. y Davis, D.R. (1988). Solvent extraction of lipid components from egg yolk solids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1136-1139.

Zeidler, G., Pasin, G. y King, A. (1992). Improvements of cholesterol removal from liquid egg yolk by supercritical extraction through modifications of the yolk emulsion system. Presentado en la congreso *Fat and cholesterol reduced food*, Nueva Orleans, Louisiana, abril 1-3.

IV.A.2. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DEL HUEVO FRESCO: DETERMINACIÓN, VARIABILIDAD Y VALOR NUTRICIONAL.

1. INTRODUCCIÓN.	163
1. Aspectos controvertidos en la determinación de ésteres metílicos de los ácidos grasos.	164
1. La discriminación: un problema a evitar en la determinación de ésteres metílicos de los ácidos grasos.	164
2 Los factores de respuesta relativos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.	166
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	169
1. Muestras.	169
2. Reactivos.	170
3. Extracción de la grasa.	171
4. Obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.	172
5. Determinación cromatográfica.	172
6. Identificación de los ácidos grasos.	174
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	177
1. Cálculo de los factores de respuesta relativos.	177
2. Composición en ácidos grasos del huevo fresco.	187
3. El sistema de explotación y la dieta de las ponedoras: dos factores que influyen en la composición en ácidos grasos del huevo.	192
1. Comparación de la composición en ácidos grasos en huevos procedentes de dos sistemas de explotación.	192
2. Influencia de la dieta de las ponedoras sobre la composición en ácidos grasos de sus huevos.	193
3. Conclusiones que se deducen de los estudios de correlación entre los distintos ácidos grasos determinados.	202
4. CONCLUSIONES GLOBALES.	204
5. BIBLIOGRAFÍA.	205

1.INTRODUCCIÓN.

Desde un punto de vista nutricional, el huevo es uno de los alimentos más interesantes como fuente de proteínas de alta calidad y de vitaminas liposolubles; pero la presencia de una proporción considerable de grasa y, especialmente, de colesterol ha provocado un cierto rechazo del huevo por amplios sectores de la población. Esto ha conducido a un claro descenso del consumo de este alimento en muchos países desarrollados durante las últimas décadas (OCDE, 1988; Richardson, 1992).

Aunque el contenido de colesterol del huevo es realmente alto y ello puede suponer una participación significativa en la ingestión global de colesterol en nuestra dieta, deben hacerse una serie de puntualizaciones, apoyadas por la enorme cantidad de estudios que se vienen desarrollando sobre la influencia de la ingestión de colesterol sobre los niveles de colesterol plasmático. Los resultados parecen ir en la dirección de señalar que, la calidad nutricional de un alimento no debe evaluarse únicamente respecto al contenido de colesterol, sino que la composición de la grasa total del mismo (de ácidos grasos saturados, mono y polinsaturados) tiene incluso mayor influencia que el propio colesterol sobre los niveles de este compuesto en plasma y, por tanto, sobre las patologías relacionadas con dichos niveles (Grundy y Denke, 1990; Hayes *et al.*, 1991; Hegsted *et al.*, 1965; Hopkins, 1992; Keys *et al.*, 1965; Khosla y Hayes, 1992; Pyörälä, 1987; Rudel *et al.*, 1990).

Las composiciones en ácidos grasos dadas por diferentes autores y "tablas de composición de alimentos" son poco completas en cuanto a ácidos grasos polinsaturados y *trans*-monoeno se refiere. En este capítulo se intenta ofrecer una composición en ácidos grasos que contribuya a establecer los niveles de estos dos tipos de ácidos en el huevo. Los exhaustivos resultados obtenidos para los ácidos grasos polinsaturados nos permitieron discutir ampliamente el valor nutricional del huevo. Al mismo tiempo, se intentó relacionar el sistema de explotación y la dieta de las ponedoras con la composición en ácidos grasos de sus huevos.

En este capítulo se puso especial atención a una serie de aspectos analíticos que influyen sobre la exactitud con que se realiza la determinación de los ácidos grasos. Además se

calcularon los factores de respuesta relativos de cada ácido graso, los cuales fueron utilizados para obtener la composición en ácidos grasos.

1.1.ASPECTOS CONTROVERTIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

1.1.1.LA DISCRIMINACIÓN: UN PROBLEMA A EVITAR EN LA DETERMINACIÓN DE ÉSTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

La determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG) por cromatografía de gases presenta como punto más crítico la inyección de la muestra. Este punto, está directamente relacionado con el problema de la discriminación, entendido como el hecho originado por el distinto comportamiento de los EMAG en el inyector, en función de su punto de ebullición. La causa de este problema se encuentra en los fenómenos diferenciados de vaporización y condensación de los EMAG que implican una discriminación en la entrada de estos analitos en la columna y, por tanto, una falta de exactitud y precisión en los resultados obtenidos. La inyección de los EMAG en un cromatógrafo se puede realizar según diferentes técnicas: con partición (split), sin partición (splitless), con introducción de la muestra directamente en la cabeza de columna (on-column) y con programación de la temperatura de vaporización (PTV) (programmed temperature vaporizing). Esta última técnica consiste en programar la temperatura del inyector de tal manera que inicialmente se encuentre durante un tiempo a baja temperatura y posteriormente suba a gran velocidad hasta alta temperatura. Esta técnica de la PTV permite trabajar a su vez con partición, sin partición y con eliminación de disolvente (Solvent elimination). La inyección con eliminación de disolvente consiste en mantener la válvula de partición abierta durante un corto espacio de tiempo tras la inyección para que se elimine el disolvente y, a continuación, esta válvula se cierra totalmente para que entren en la columna los EMAG. Según diferentes autores de todas estas técnicas las que permiten trabajar con mayor exactitud y precisión, por evitar la discriminación, son las que trabajan con introducción directa de la muestra en la cabeza de columna, como es lógico, y con PTV (Badings y de Jong, 1988; Craske y Bannon, 1987; Eder *et al.*, 1991). No obstante, estas dos técnicas no se encuentran al alcance de todos los laboratorios y no tan solo presentan ventajas. Uno de los principales inconvenientes, en el

caso de la inyección directa de la muestra en la cabeza de columna, es la introducción sistemática de pequeñas cantidades de moléculas con alto punto de ebullición que implican una degradación de la columna. En el caso de la determinación de EMAG estas moléculas son: esteroides, tocoferoles y TG que no han sido totalmente convertidos a ésteres metílicos (EM). Este problema, que prácticamente no se presenta cuando se trabaja con partición, puede ser evitado parcialmente mediante una precolumna.

Por otro lado, la técnica más ampliamente empleada es la que trabaja con partición. Sin embargo, existe una gran controversia sobre la posibilidad o no de evitar la discriminación al trabajar con esta técnica. Algunos autores (Bannon *et al.*, 1986, 1987; Volmer *et al.*, 1988) han obtenido excelentes resultados en exactitud y precisión al trabajar con ella, mientras otros han llegado a decir que es casi imposible diseñar un sistema de inyección con partición que no sea discriminante (Grob y Neukom, 1979). En un término medio, es ampliamente aceptado por expertos en el tema que, para evitar la discriminación en la medida de lo posible, es necesario observar una serie de precauciones. Según un trabajo de Bannon *et al.* (1987) las precauciones más importantes a tomar son las siguientes:

- evitar la discriminación en la aguja de la jeringa
- conseguir una rápida vaporización de la muestra
- obtener una buena homogeneización entre la muestra vaporizada y el gas portador

Evitar la discriminación en la aguja de la jeringa: se consigue con una gran velocidad de inyección.

Conseguir una rápida vaporización de la muestra: se consigue con una temperatura de inyector relativamente alta, inyectando pequeños volúmenes de muestra y muestras bastante diluidas. Las temperaturas de inyector ensayadas por Bannon *et al.* (1987) en su estudio fueron 375 °C, 340 °C, 300 °C y 250 °C. La exactitud de los resultados mejoró con el aumento de temperatura del inyector. Sin embargo, muchos autores señalan estas altas temperaturas como causantes de descomposición en los ésteres metílicos de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). No obstante, los autores de este trabajo comprobaron que no existe pérdida de estos EM incluso al trabajar con C20:5 y C22:6 a 375 °C, comprobación que hay

que tomar con cautela por la falta de estudios que trabajen a estas altas temperaturas. Los volúmenes de muestra ensayados fueron 1, 2 y 3 μl , resultando el que implicaba una mejor exactitud el de 1 μl . Las concentraciones con que se trabajó fueron 1, 3, 5 y 10%, concluyéndose que las concentraciones más adecuadas son las que oscilan entre 1-3%.

Obtener una buena homogeneización entre la muestra vaporizada y el gas portador: es crítico, para ello, el diseño del tubo de inserción del inyector. En este trabajo de Bannon *et al.* (1987) se ensayaron 4 diseños distintos entre los cuales se encontraron diferencias de exactitud. El que presentó mayor exactitud fue el de doble copa de mezcla. Esta copa de mezcla fue descrita por primera vez por Jennings (1975). Los dos diseños probados con una sola copa de mezcla presentaron exactitud similar, presentándose menor exactitud para el modelo sin copa de Jennings. En los cuatro tipos de tubos ensayados se introdujo lana de vidrio silanizada. Según diversos autores la utilización de esta lana de vidrio y de perlas de vidrio silanizadas resulta ser un factor importante para conseguir la homogeneización pretendida y evitar la discriminación (Bayer y Liu, 1983; Craske y Bannon, 1987). No obstante, un exceso de esta lana o de su compactación favorece la adsorción, que afecta más intensamente a los EMAG con mayor punto de ebullición, y por tanto implica una discriminación (Bayer y Liu, 1983).

Por otro lado, cabe destacar que la relación de partición utilizada puede contribuir a evitar la discriminación. De un estudio, en donde se compararon tres relaciones de partición, realizado por Volmer *et al.* (1988) resultó que la relación de partición más adecuada para evitar la discriminación, entre los EMAG de 12 o más átomos de carbono, es la de 1:30.

1.1.2. LOS FACTORES DE RESPUESTA RELATIVOS DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

De forma general, entre la comunidad científica dedicada al análisis de AG, se acepta la determinación de los factores de respuesta relativos (FRR) de los EMAG frente al detector de ionización de llama (DIL), a partir de la inyección de mezclas de concentración conocida de estos compuestos. Estos FRR a continuación son utilizados para la corrección de las áreas obtenidas a partir del integrador. No obstante, según algunos autores (Badings y de Jong,

1988; Bannon *et al.*, 1986; Craske y Bannon, 1987) estos FRR empíricos serían equivalentes a los FRR teóricos frente al DIL propuestos por Ackman y Sipos (1964a,b) multiplicados por un factor de error que agrupa los diferentes errores sistemáticos del método. Para realizar esta afirmación, estos autores se basan en los diferentes trabajos en los que se demuestra que, en condiciones muy controladas, los FRR empíricos (FRRE) no difieren significativamente de los FRR teóricos (FRRT). Albertyn *et al.* (1982) demostraron este hecho para los ésteres metílicos de los ácidos grasos saturados (AGS) entre el C8:0-C18:0. Más tarde, en 1985, Bannon *et al.* hicieron lo mismo para los EM del C4:0 y C6:0. Por último, en 1986, Bannon *et al.* constataron el mismo hecho para los ésteres metílicos de los ácidos grasos insaturados (AGI) C18:1 n-9, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6 y C22:6 n-3 y para los EM del C17:0, C20:0 y C22:0. Así pues, para estos autores, sólo la aplicación de los FRRT, tras la eliminación de los errores sistemáticos del método, es correcta.

A continuación se discuten brevemente las condiciones que deben cumplirse para conseguir una buena exactitud y la eliminación de estos errores sistemáticos (Craske y Bannon, 1987):

- utilización de un sistema computerizado de integración o de un integrador;
- utilización de columnas capilares adecuadas;
- optimización de la preparación de los EM;
- existencia de linealidad frente al DIL;
- evitar la discriminación.

Utilización de un sistema computerizado de integración o de un integrador: la utilización de un integrador presenta ventajas, en cuanto a la precisión con que se miden las áreas de los picos cromatográficos, frente a los métodos de integración manual (Willett, 1987). Por otro lado, cabe tener en cuenta que los modernos sistemas computerizados de integración, ya sean integradores personales o ordenadores con potentes programas de adquisición y tratamiento de datos cromatográficos, permiten detectar con mayor exactitud y precisión el inicio y final de pico. Según esto, estos sistemas computerizados de integración serían, presumiblemente, más precisos que los integradores. No obstante, en la bibliografía consultada no se han encontrado estudios comparativos entre los sistemas computerizados de integración y los integradores.

Utilización de columnas capilares adecuadas: según Craske y Bannon (1987) las columnas capilares más adecuadas para este tipo de análisis son las de sílice fundida, con diámetro interno entre 0.2-0.35 mm y con fases altamente polares, como son: DEGS (dietilenglicolsuccinato), SP-2330 (68% cianopropil silicona) y CP-Sil 88 (100% cianopropil silicona). No obstante, actualmente las dos fases más utilizadas son la SP-2340 (75% cianopropil silicona) y la CP-Sil 88.

Optimización de la preparación de los ésteres metílicos: existen multitud de protocolos de metilación pero, en definitiva, la mayoría de los usados actualmente para la determinación de ácidos grasos (AG) se pueden agrupar en 2 tipos:

- 1) Los que utilizan metóxido sódico;
- 2) Los que utilizan trifluoruro de boro.

1) En estos métodos la metilación se realiza mediante un tratamiento de la grasa con una solución metanólica de metóxido sódico. No obstante, la acción única de dicho reactivo no consigue la metilación de los ácidos grasos libres (AGL). La metilación de estos AG, que tras la acción del metóxido quedan en forma de jabones, puede conseguirse mediante la acidificación del medio con un ácido inorgánico. Esta última etapa de acidificación no se halla descrita en todos los protocolos revisados.

2) Los métodos en los que la metilación es catalizada por el complejo trifluoruro de boro-metanol poseen una primera etapa de saponificación de la grasa y una segunda en donde se acidifica el medio por adición de solución metanólica del complejo anteriormente citado y consecuentemente se produce la metilación. Las soluciones de este complejo se consiguen disolviendo trifluoruro de boro en metanol (12-14 %, p/v). Estas soluciones deben guardarse refrigeradas. El uso de soluciones demasiado concentradas, que llevan mucho tiempo preparadas o mal conservadas conlleva la formación de artefactos y la pérdida de cantidades apreciables de AGPI (Christie, 1990). Estos métodos consiguen metilar los AGL.

En nuestro estudio la metilación se llevó a cabo mediante un método que combina los 2 tipos anteriores. Consistió en una primera fase en donde se producía una metilación por

tratamiento de la grasa en caliente con una solución metanólica de metóxido sódico y una segunda fase en la que se acidificaba el medio con solución metanólica del complejo trifluoruro de boro-metanol. En esta última fase se metilaban los AGL.

Uno de los problemas de la obtención de EMAG consiste en la extracción de estos compuestos tras la metilación. Según diversos autores la extracción es mucho más rápida cuando se trabaja a una temperatura entre 30-40 °C (Bannon *et al.*, 1982a, b). Más problemática es la extracción de los EMAG de cadena corta con menos de 10 átomos de carbono. Se ha visto que los alcanos usualmente empleados para la extracción de los EMAG tras la metilación (n-hexano, heptano e isoctano) no extraen cuantitativamente los EMAG de cadena corta. No obstante, la extracción de estos EM pasa a ser cuantitativa tras la adición de pequeñas cantidades de éter etílico a estos disolventes (Bannon *et al.*, 1982a; Craske y Bannon, 1987).

Existencia de linealidad frente al DIL: en caso de que la linealidad no sea buena se puede mejorar consiguiendo una relación óptima entre el gas portador y el H₂. No obstante, este problema es poco importante cuando se trabaja con columnas capilares y pequeñas cantidades de muestra (Albertyn *et al.*, 1982).

Evitar la discriminación: este punto, que es la fuente de error más importante en la determinación de EMAG cuando se trabaja con partición, ha sido ya ampliamente debatido anteriormente.

2.MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.MUESTRAS.

Con el fin de comparar la composición en AG de huevos procedentes de grandes y pequeñas explotaciones, se analizaron 23 muestras de cada tipo. Los huevos procedentes de grandes explotaciones se compraron embalados en supermercados de distintas localidades catalanas, mientras que los procedentes de pequeñas explotaciones fueron obtenidos de granjas, en donde las ponedoras eran alimentadas con una dieta en la que el pienso era sustituido, en

parte, por cereales (trigo, maíz y cebada), hortalizas (col, acelgas y patatas), forraje y pan remojado. Además, las gallinas de estas granjas se encontraban en estado de semilibertad.

15 de las 23 muestras procedentes de pequeñas explotaciones se tomaron de tres granjas (5 de cada granja). En estas 3 granjas se utilizaba el mismo pienso que se sustituyó, de forma creciente de la granja 3 a la 1, por la dieta ya descrita (cereales, hortalizas, forraje y pan remojado). Esto se hizo para estudiar como influía la proporción de pienso, presente en la dieta de las ponedoras, sobre la composición en AG de la fracción lipídica del huevo. En las tres granjas las gallinas eran de la misma raza (New Hampshire) y edad. Además, para determinar la composición en AG del pienso utilizado se tomaron 9 muestras de él, 3 de cada granja, en las que se analizó la composición en AG.

Preparación de la muestra: 4 huevos de cada una de las muestras se cascaron y se homogeneizaron en un vaso de precipitados mediante una batidora. A continuación, se procedió inmediatamente a la extracción de la fase lipídica.

2.2.REACTIVOS.

Todos los disolventes utilizados cumplían las especificaciones marcadas por la ACS: el cloroformo, el metanol y el éter dietílico fueron comprados a Panreac, Montplet & Esteban (Barcelona, España); y el n-hexano a E. Merck (Darmstadt, Alemania).

Los demás reactivos fueron de la calidad y procedencia que se indica a continuación: el sulfato sódico anhidro y el cloruro sódico (ambos para análisis) fueron suministrados por Panreac; el sodio (para síntesis), la fenolftaleína (ACS) y la solución metanólica de trifloruro de boro (14%, p/v; para síntesis) por E. Merck.

Todos los patrones empleados fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) excepto el EM del C12:0 que lo fue por Alltech Associates, Inc. (Deerfield, IL). Todos estos patrones tenían como mínimo una pureza del 99% excepto el EM del C20:2 n-6 que poseía una pureza del 98%. Una mezcla de EM (PUFA-2) fue comprada a Supelco, Inc. (Bellefonte, PA).

2.3. EXTRACCIÓN DE LA GRASA.

La extracción se realizó siguiendo el método propuesto por Folch *et al.* (1957), con alguna modificación, según el protocolo que se describe a continuación. Se pesaron aproximadamente 2.5 g de huevo fresco homogeneizado en un Erlenmeyer de 25 ml y se añadieron 15 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v). La mezcla se sometió a agitación magnética durante 30 minutos y a continuación se decantó el líquido sobre un embudo con papel de filtro, recogiendo el filtrado sobre un tubo Pyrex con tapón de rosca con junta de teflon (26 x 100). Tras ello, el residuo que quedó en el Erlenmeyer se reextrajo con 10 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v) durante 20 minutos. A continuación se filtró la mezcla y se lavó el Erlenmeyer y el residuo del papel de filtro con 5 ml más de la mezcla de disolventes. Estas dos últimas fracciones de filtrado se recogieron sobre el mismo tubo que la anterior, sobre ellas se añadieron 5 ml de agua destilada, el tubo se tapó, se agitó y se centrifugó a 2200 rpm durante 20 minutos. La fase inferior clorofórmica se filtró sobre sulfato sódico anhidro y el filtrado se recogió sobre un matraz de fondo redondo. El sulfato sódico del embudo se lavó con 5 porciones de 3 ml de cloroformo, que también se recogieron sobre el matraz de fondo redondo. Se eliminó el disolvente mediante un evaporador rotatorio de vacío, a una temperatura de 35 °C. A continuación, se colocó el matraz en un desecador, en donde se aplicó un vacío creciente para eliminar las últimas fracciones de disolvente. Después de 10 horas en el desecador, con un vacío de 750 mm Hg, se pesó el matraz con la grasa y se calculó el rendimiento de la extracción. Una vez hecho esto, se pasó la grasa cuantitativamente a un tubo Pyrex con tapón de rosca y junta de teflon (16 x 160) mediante disolución en éter etílico. El disolvente se dejó evaporar bajo campana, pero las últimas fracciones se eliminaron mediante leve corriente de nitrógeno y, a continuación, en un desecador con la aplicación de vacío progresivo. Después de 30 minutos en el desecador, con un vacío de 750 mm Hg, se procedió a la metilación.

La eliminación del éter etílico no ha de ser necesariamente exhaustiva ya que pequeñas cantidades de este disolvente favorecen la disolución de la grasa en metanol, con lo cual la formación de una única fase homogénea al añadir posteriormente la solución metanólica de metóxido sódico, durante el proceso de metilación, no representa ningún problema. Esto, al mismo tiempo, implica un aumento en la velocidad de la reacción de metanólisis y también,

por otro lado, favorece la extracción de los EMAG de cadena corta, con 10 átomos de carbono o menos (Bannon *et al.*, 1982a; Craske y Bannon, 1987).

2.4.OBTENCIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

La metilación de los AG se llevó a cabo mediante el protocolo que se describe a continuación. Al tubo, con una cantidad de grasa que oscilaba alrededor de los 240 mg, se le añadieron 2.5 ml de solución metanólica de metóxido sódico 0.5N, se tapó herméticamente y se introdujo en un baño-maría a ebullición, donde permaneció durante 20 minutos o bien hasta la obtención de una única fase homogénea. Se enfrió el tubo antes de destaparlo, se le añadieron unas gotas de solución metanólica de fenolftaleína (1%, p/v) y, a continuación, 3 ml de solución metanólica de trifluoruro de boro (14%, p/v). El indicador debe virar. En caso de no ser así, se debe añadir reactivo hasta la decoloración del indicador. El tubo se tapó de nuevo y se introdujo en el baño-maría hirviente durante 15 minutos. A continuación, el tubo se enfrió hasta 30-40°C y se añadieron 1 ml de hexano y 4 ml de solución saturada de cloruro sódico. El tubo se tapó y se agitó enérgicamente durante 30 segundos. A continuación se esperó hasta la separación de las dos fases y mediante una pipeta Pasteur se transfirió la fase hexánica a un tubo Pyrex (10 x 75) con una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro. Después de un mínimo de una hora de contacto entre la solución hexánica y el sulfato se procedió a la inyección de los EM en el cromatógrafo de gases.

La extracción se realizó a 30-40 °C, ya que ésta es la temperatura a la cual se extraen mejor los EMAG (Bannon *et al.*, 1982a, b), como ya se discutió anteriormente.

2.5.DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA.

Los EM se inyectaron manualmente en un cromatógrafo Perkin Elmer Sigma 2000. La inyección se realizó a la mayor velocidad posible. El cromatógrafo estaba equipado con un detector de ionización de llama, una precolumna de sílice fundida (2.5 m x 0.25 mm d.i.) con recubrimiento interno de cianopropil/fenil/metil silicona desactivada y una columna capilar de sílice fundida (50 m x 0.25 mm d.i.) con 0.2 µm de espesor de recubrimiento interno de fase estacionaria de 100% cianopropil silicona (CP-Sil 88) de Chrompack

(Middelburg, Holanda). La precolumna y la columna habían sido adquiridas recientemente y no habían sido utilizadas con anterioridad. El tubo de inserción del inyector contenía una capa de 0.5 cm de perlas de vidrio silanizadas situada entre 2 capas de 2 cm de lana de vidrio silanizada poco compactadas. Las condiciones cromatográficas usadas fueron:

-programas de temperatura de horno:

- 1) 11.2 min a 177 °C, de 177 °C hasta 225 °C a 7 °C/min y 11 min a esta última temperatura;
- 2) 10 min a 166 °C, de 166 °C hasta 210 °C a 3 °C/min, de 210 °C hasta 230 °C a 7 °C/min y 6 min a esta última temperatura;
- 3) 10 min a 170 °C, de 170 °C hasta 210 °C a 2 °C/min, de 210 °C, hasta 230 °C a 7 °C/min y 8 min a esta última temperatura;
- 4) 1 min a 170 °C, de 170 °C hasta 210 °C a 3 °C/min, 2 min a 210 °C, de esta temperatura hasta 230 °C a 7 °C/min y 7 min a esta última temperatura;

-temperatura del inyector: 270 °C;

-temperatura del detector: 300 °C;

-relación de partición: 1:30;

-presión de entrada: 24 psi;

-volumen inyectado: 0.2-0.5 μ l.

La temperatura de inyector elegida fue de 270 °C, ya que, aunque no es la mejor para evitar la discriminación, sí asegura la no descomposición de los EMAG altamente insaturados, los cuales están presentes en el huevo en cantidades apreciables.

La adquisición y el tratamiento de datos cromatográficos fueron realizados mediante un integrador personal PE Nelson modelo 1020.

El programa 1 fue utilizado para el cálculo de los factores de respuesta relativos y para la determinación de EMAG en las diferentes muestras analizadas. Los demás programas sólo fueron utilizados para la identificación de picos.

2.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

Una primera aproximación de la identidad de los picos del cromatograma se realizó bibliográficamente. A continuación se inyectaron patrones de los EMAG que presumiblemente correspondían a los picos del cromatograma y sus tiempos de retención relativos se utilizaron para acabar de perfilar la identificación. Por último, la identificación de cada uno de los picos del cromatograma fue confirmada por adición de patrón a un extracto metilado de huevo. En aquellos casos en que el pico a identificar era mayoritario, previamente a la adición, el extracto se diluyó de tal manera que el pico tuviera un área similar a la resultante de inyectar una solución de concentración entre 0.15-0.30 mg/ml del patrón correspondiente. La adición, en todos los casos, se realizó de tal manera que la cantidad de patrón adicionada supusiera un aumento en el área del pico problema de entre un 50-100%. La mezcla extracto-patrón se inyectó varias veces en el cromatógrafo empleando, en función de cada caso, los programas de temperatura de horno, descritos anteriormente, que más se adecuaron. Los programas a ensayar para cada mezcla extracto-patrón se eligieron en función del tiempo de retención del pico a identificar, pues, entre estos programas los hay que separan mejor los picos con bajo TR y otros que hacen lo propio con los picos con alto TR. Sólo se dio por confirmada la identificación en el caso de que el pico resultante del problema más el patrón fuera simétrico en todos y cada uno de los cromatogramas obtenidos a las distintas condiciones de temperatura ensayadas. En aquellos casos en que se diluyó el extracto fue para trabajar con picos pequeños en los que, cuando el compuesto que da el pico problema no coincide con el patrón adicionado, es más fácil observar asimetría o desdoblamiento.

La identificación del ester metílico del C22:5 n-3 se realizó de forma análoga pero utilizando una mezcla de patrones (PUFA-2, de Supelco) en donde se encontraba el éster metílico de este ácido graso.

La identificación del EM del C22:5 n-6, al no disponerse de patrón de este ácido ni puro ni como mezcla, se realizó a partir de la bibliografía consultada (Chrompack, 1988; Eder *et al.*, 1991; Simopoulos y Salem, 1989, 1992).

El programa de temperatura 1 no separa el EM del C14:1 n-5 del del C15:0 (figura 1, pico 3) cosa que si hacen los programas 3 y 4. En la figura 2 se muestra un cromatograma obtenido con las condiciones de temperatura del programa 4 en el que vemos que el pico número 3 de la figura 1 se ha desdoblado en 3 picos: EM del C14:1 n-5, EM del C15:0 y un tercer pico desconocido. La identificación de estos picos se realizó según se ha descrito anteriormente, utilizando los programas 3 y 4. Con el programa 4 se inyectaron al azar 5 extractos metilados de huevo fresco y se obtuvo que el pico número 3 de la figura 1 poseía, como media, el 22% de su área debida al EM del C14:1 n-5, el 47% debida al EM del C15:0 y el resto debida al pico desconocido. Estos datos fueron utilizados para el calculo de la normalización, normalización interna corregida y contenido de estos AG en mg sobre 100g de huevo fresco (fracción comestible).

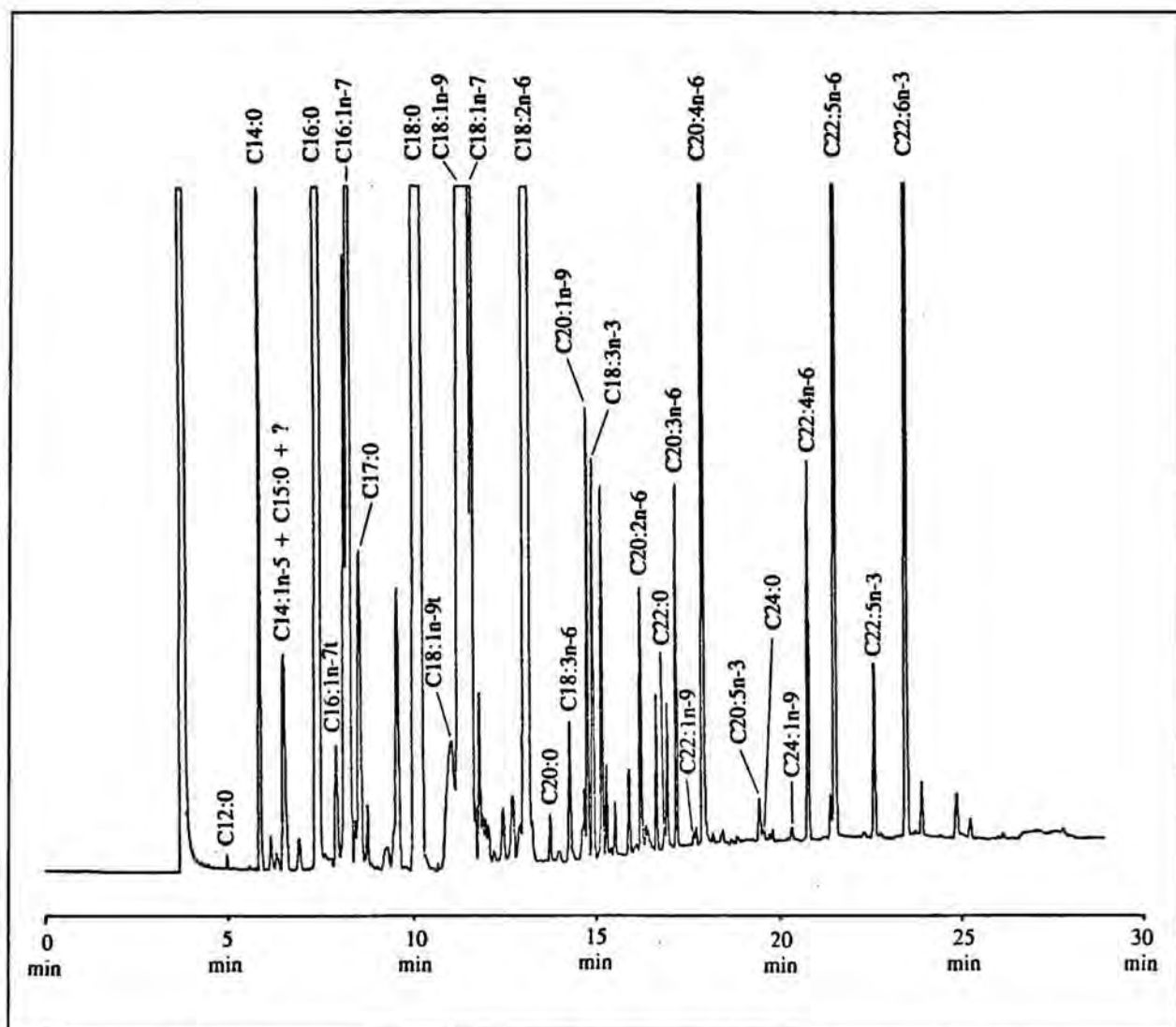


Figura 1-Cromatograma de un extracto metilado de huevo fresco con los diferentes picos identificados (programa 1).

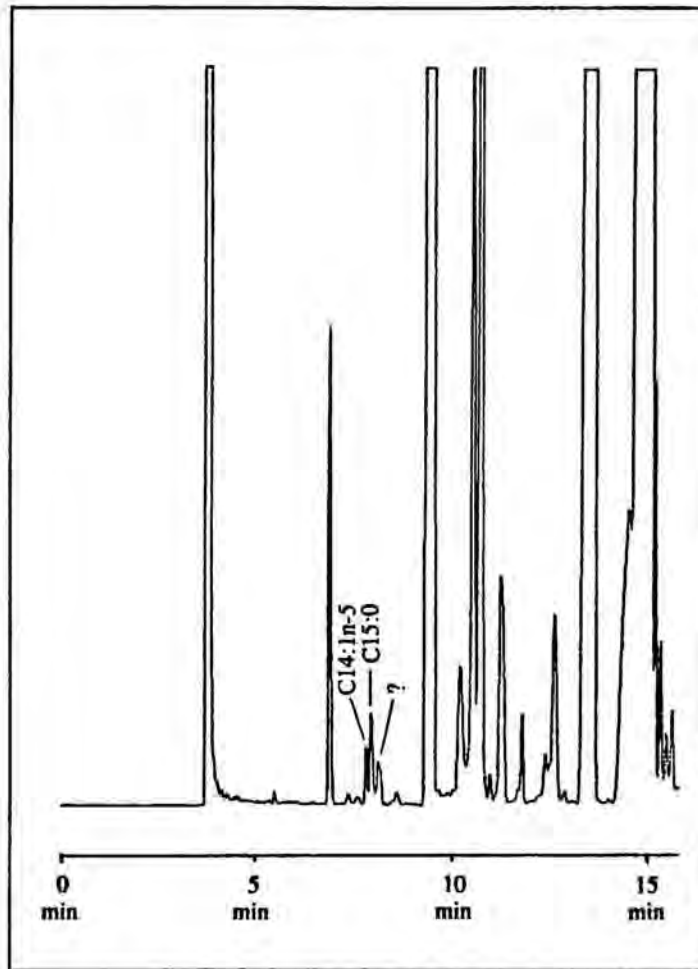


Figura 2-Primera parte de un cromatograma de un extracto metilado de huevo fresco (programa 4).

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1.CALCULO DE LOS FACTORES DE RESPUESTA RELATIVOS.

Los diferentes EMAG de los cuales se quería obtener su factor de respuesta se dividieron en dos grupos: A y B. Esta división se realizó de tal manera que los EMAG ordenados de menor a mayor tiempo de retención se iban asignando alternativamente a cada uno de los grupos. De los patrones de los EMAG del grupo A se hicieron 10 mezclas con niveles de concentración crecientes (tabla 1). Cada una de estas mezclas se preparó por cuadruplicado, resultando un total de 40 mezclas que se inyectaron para calcular los FRRE. Lo mismo se

hizo con los patrones de los EMAG del grupo B (tabla 2). De esta manera, al pertenecer a grupos diferentes, se evitó la superposición que se producía, al utilizar el programa de temperatura 1, entre el EM del C14:1 n-5 y el del C15:0. De la misma manera, se obviaron solapamientos entre picos colindantes.

El patrón interno elegido es el EM del C20:0, pues, presenta un tiempo de retención (13.832 min) centrado en el intervalo definido por los tiempos de retención del primer (4.973) y último (23.588 min) de los EMAG de los que se quieren calcular sus FRRE. Además, este EM, como todos los de AGS, presenta una estabilidad que le confiere ventajas, respecto a los EM de los AGI, en el momento de utilizarlo como patrón interno. No obstante, todos los patrones habían sido recién comprados en el momento de su uso en este trabajo, lo cual ofrecía garantías de pureza.

Los factores de respuesta se calcularon, tras la inyección de estas mezclas de EMAG, mediante la fórmula siguiente:

$$FRRE = \frac{P_{px} \cdot A_{pi}}{A_{px} \cdot P_{pi}}$$

P_{px} = peso de EMAG problema;

A_{px} = área de EMAG problema;

P_{pi} = peso de EMAG utilizado como patrón interno;

A_{pi} = área de EMAG utilizado como patrón interno.

Este cálculo fue realizado por medio del integrador personal PE Nelson modelo 1020. Además de la media de los FRRE, el integrador calcula su desviación estándar, su coeficiente de variación (%) y el coeficiente de determinación (r^2). Este coeficiente expresa la linealidad de la respuesta de los diferentes EMAG frente al detector de ionización de llama y corresponde a la recta de regresión de y (A_{px}/A_{pi}) sobre x (P_{px}/P_{pi}). Todos estos valores para los diferentes EMAG, ordenados de menor a mayor tiempo de retención (TR), se hallan reflejados en la tabla 3. En la primera columna de esta tabla se indica el número de átomos

de carbono, el número de dobles enlaces y la serie del AG. La configuración del doble enlace sólo se indica en esta columna cuando es *trans*, siendo en aquellos casos en que no se indica *cis*. Son excepción a esta regla el C22:5 n-6 y el C22:5 n-3 para los cuales no se conoce la estereoquímica de sus dobles enlaces. Estas puntualizaciones son validas para todo el trabajo y se realizan en base a que los patrones de EMAG insaturados, usados en el estudio, presentaban sus dobles enlaces en configuración *cis*, a excepción, lógicamente, de los EM del C16:1 n-7t (palmitelaidico) y del C18:1 n-9t (elaidico). Al no disponerse de patrones puros con estereoquímica conocida del C22:5 n-6 y del C22:5 n-3 no podemos precisar la configuración de sus dobles enlaces. En la segunda columna de esta tabla aparecen los nombres comunes de los AG. Estos nombres, para los AG polinsaturados con 20 o más átomos de carbono, están sujetos a una gran controversia. Así, con el nombre dihomogamma-linolénico se designa el AG con 20 átomos de carbono y 3 dobles enlaces, en configuración no especificada, situados en las posiciones 8, 11 y 14. De este modo bajo este nombre, se agrupan los diferentes estereoisómeros del C20:3 n-6 y sus mezclas (Fondation Française pour la Nutrition, 1987; Small *et al.*, 1986). En cuanto al araquidónico los diferentes autores están de acuerdo en que con este nombre se designa el AG con 20 átomos de carbono y 4 dobles enlaces situados en las posiciones 5, 8, 11 y 14. No obstante, no existe acuerdo en la estereoquímica de estos dobles enlaces; ya que mientras para la mayoría de autores no sería especificada y bajo este nombre se agruparían los diferentes estereoisómeros del C20:4 n-6 y sus mezclas (Fondation Française pour la Nutrition, 1987; Small *et al.* 1986); para algunos otros este nombre sólo designaría el C20:4 n-6 con todos sus enlaces en configuración *cis* (Gunstone y Herslöf, 1992; Sigma, 1993). Parece ser que la tendencia que se sigue en algunos trabajos recientes, en cuanto a la controversia referente al araquidónico, es la de este último grupo de autores. Por otra parte, el nombre timnodónico inicialmente se aplicó al AG con 20 átomos de carbono y 5 dobles enlaces con estereoquímica no especificada, situados en las posiciones 4, 8, 12, 15 y 18 (Gunstone y Herslöf, 1992; Small *et al.* 1986). No obstante, en trabajos más recientes este nombre se aplica al C20:5 n-3 con estereoquímica no especificada (Gunstone y Herslöf, 1992; Fondation française pour la nutrition, 1987). El caso del clupanodónico es similar, ya que inicialmente se aplicó este nombre al conjunto de los AG de 22 átomos de carbono altamente insaturados presentes en los aceites de pescado, posteriormente Small *et al.* (1986) lo aplicaron al 4,8,12,15,19-C22:5 con estereoquímica no especificada y actualmente lo que está claro,

según Gunstone y Herslöf (1992), es que bajo este nombre se agrupan los diferentes isómeros del docosapentaenoico (C22:5). La conclusión que podemos sacar de toda esta discusión es que para evitar confusiones, cuando se habla de AG, se debería utilizar su nombre sistemático o su fórmula abreviada. Esta fórmula abreviada, que incluye el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces, la serie y la configuración del AG, se ha designado en la primera columna de la tabla 3 con el símbolo N° Át. de C.

Tabla 1-Peso exacto (μg) de los diferentes EMAG del grupo A a los diferentes niveles de concentración.*

NC ^a	C12:0	C14:1n-5	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9	C18:2n-6
1	49.7	48.0	46.7	48.5	51.2	51.1	45.3
2	99.4	96.0	93.3	96.9	102.3	102.1	90.6
3	149.2	144.0	140.0	145.4	153.5	153.2	136.0
4	198.9	192.1	186.7	193.8	204.6	204.3	181.3
5	248.6	240.1	233.3	242.3	255.8	255.3	226.6
6	298.3	288.1	280.0	290.7	306.9	306.4	271.9
7	348.0	336.1	326.7	339.2	358.1	357.4	317.3
8	397.7	384.1	373.3	387.6	409.2	408.5	362.6
9	447.5	432.1	420.0	436.1	460.4	459.6	407.9
10	596.6	576.2	560.0	581.4	613.8	612.8	543.9
NC	C20:0 ^b	C20:1n-9	C20:2n-6	C20:3n-6	C20:4n-6	C24:0	C22:4n-6
1	291.2	50.0	52.0	48.9	—	51.8	49.2
2	291.2	99.9	104.0	97.7	42.9	103.7	98.4
3	291.2	149.9	155.9	146.6	64.3	155.5	147.6
4	291.2	199.8	207.9	195.5	85.7	207.3	196.8
5	291.2	249.8	259.9	244.3	107.2	259.2	246.0
6	291.2	299.7	311.9	293.2	128.6	311.0	295.2
7	291.2	349.7	363.8	342.1	150.0	362.9	344.4
8	291.2	399.6	415.8	390.9	171.5	414.7	393.6
9	291.2	449.6	467.8	439.8	192.9	466.5	442.8
10	291.2	599.5	623.7	586.4	—	622.0	590.4

^a NC = nivel de concentración.

^b Patrón interno.

* NOTA: para cada nivel, los pesos de EMAG se disolvieron en 200 μl de n-hexano y se inyectaron 0.5 μl de la mezcla.

Tabla 2-Peso exacto (μg) de los EMAG del grupo B a los diferentes niveles de concentración.*

NC ^a	C14:0	C15:0	C16:1n-7t	C17:0	C18:1n-9t	C18:1n-7	C20:0 ^b
1	49.7	54.1	48.5	55.0	49.0	51.1	291.2
2	99.4	108.2	96.9	110.0	98.1	102.1	291.2
3	149.2	162.3	145.4	165.0	147.1	153.2	291.2
4	198.9	216.5	193.8	220.0	196.2	204.2	291.2
5	248.6	270.6	242.3	275.0	245.2	255.3	291.2
6	298.3	324.7	290.7	330.0	249.3	306.3	291.2
7	348.0	378.8	339.2	385.0	343.3	357.4	291.2
8	397.7	432.9	387.6	440.0	392.4	408.4	291.2
9	447.5	487.0	436.1	495.0	441.4	459.5	291.2
10	596.6	649.4	581.4	660.1	588.5	612.6	291.2
NC	C18:3n-6	C18:3n-3	C22:0	C22:1n-9	C20:5n-3	C24:1n-9	C22:6n3
1	54.1	46.2	52.9	45.7	—	48.9	—
2	108.1	92.3	105.8	91.5	93.4	97.7	65.6
3	162.2	138.5	158.7	137.2	140.1	146.6	98.5
4	216.2	184.6	211.6	183.0	186.8	195.4	131.3
5	270.3	230.8	264.5	228.7	233.5	244.3	164.1
6	324.3	276.9	317.4	274.4	280.2	293.2	196.9
7	378.4	323.1	370.3	320.2	326.9	342.2	229.7
8	432.4	369.2	423.2	365.9	—	390.9	262.5
9	486.5	415.4	476.2	411.6	—	439.7	295.4
10	—	553.8	634.9	548.9	—	586.3	—

^a NC = nivel de concentración.

^b Patrón interno.

* NOTA: para cada nivel, los pesos de EMAG se disolvieron en 200 μl de n-hexano y se inyectaron 0.5 μl de la mezcla.

Tabla 3-Linealidad de la respuesta de los diferentes EMAG frente al detector de ionización de llama (r^2), factores de respuesta relativos empíricos (FRRE) con su CV (%) y factores de respuesta relativos teóricos (FRRT).

Nº Át. de C ^a	Nombre común	n	r^2 ^b	FRRE(CV%) ^c	FRRT ^d
C12:0	Láurico	40	0.9993	0.979(5.19)	1.094
C14:0	Mirístico	40	0.9987	0.905(4.65)	1,060
C14:1 n-5	Miristoleico	40	0.9994	0.918(4.70)	1.052
C15:0	Pentadecílico	40	0.9991	0.928(4.53)	1.047
C16:0	Palmítico	40	0.9975	0.932(4.54)	1.035
C16:1 n-7t	Palmitelaidico	40	0.9995	0.935(4.63)	1.028
C16:1 n-7	Palmitoleico	40	0.9997	0.951(4.40)	1.028
C17:0	Margárico	40	0.9993	0.947(4.48)	1.025
C18:0	Estearico	40	0.9995	0.980(3.64)	1.016
C18:1 n-9t	Elaidico	40	0.9993	0.987(3.58)	1.009
C18:1 n-9	Oleico	40	0.9988	0.990(3.72)	1.009
C18:1 n-7	cis-Vaccénico	40	0.9997	1.012(3.90)	1.009
C18:2 n-6	Linoleico	40	0.9987	1.027(3.88)	1.002
C20:0	Araquídico			1 ^e	1
C18:3 n-6	gamma-Linolénico	36	0.9995	1.039(3.76)	0.995
C20:1 n-9	Gondoico	40	0.9993	1.014(3.73)	0.994
C18:3 n-3	Linolénico	40	0.9996	0.997(3.74)	0.995
C20:2 n-6		40	0.9999	1.016(3.70)	0.988
C22:0	Behénico	40	0.9979	1.004(3.65)	0.987
C20:3 n-6	dihomo-gamma-Linolénico	40	0.9991	1.044(3.77)	0.982
C22:1 n-9	Erúcico	40	0.9989	1.008(3.98)	0.982
C20:4 n-6	Araquidónico	32	0.9995	1.058(3.89)	0.975
C20:5 n-3	Timnodónico	24	0.9994	1.021(4.07)	0.969
C24:0	Lignocérico	40	0.9987	1.033(4.06)	0.977
C24:1 n-9	Nervónico	40	0.9977	1.103(5.41)	0.971
C22:4 n-6		40	0.9995	1.186(5.91)	0.965
C22:5 n-6	Clupanodónico			1.200 ^f	0.959
C22:5 n-3	Clupanodónico			1.200 ^f	0.959
C22:6 n-3		32	0.9991	1.215(6.04)	0.954

^a En esta columna se indican el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces y la serie del AG. La configuración se indica cuando es *trans* siendo en los casos en que no se indica *cis*. Para el C22:5 n-6 y el C22:5 n-3 la configuración de sus dobles enlaces es desconocida.

^b Coeficiente de determinación.

^c En esta columna se muestran los factores de respuesta relativos empíricos y su CV (%).

^d En esta columna se reflejan los factores de respuesta relativos teóricos propuestos por Ackman y Sipos (1964a) (calculados respecto al EM del C20:0).

^e Se usó como patrón interno el EM del C20:0.

^f Media de los FRRE del EM del C22:4 n-6 y del C22:6 n-3.

En la tabla 3 se reflejan también los FRRT propuestos por Ackman y Sipos (1964a) y preconizados, como ya hemos comentado, por algunos autores como los únicos correctamente aplicables en la determinación de EMAG. Del trabajo de Ackman y Sipos se desprende que la fórmula utilizada para el cálculo de estos FRRT es la siguiente:

$$\text{FRRT} = \frac{\frac{\text{P At. C} \cdot (\text{N}^\circ \text{ Át. C EMX} - 1)}{\text{PM EMX}}}{\frac{\text{P At. C} \cdot (\text{N}^\circ \text{ Át. C EMR} - 1)}{\text{PM EMR}}}$$

P At. C = peso atómico del carbono;

Nº Át. C EMX = número de átomos de carbono del EM problema;

PM EMX = peso molecular del EM problema;

Nº Át. C EMR = número de átomos de carbono del EM referencia;

PM EMR = peso molecular del EM referencia.

Los pesos atómicos utilizados para el cálculo de los FRRT mediante la fórmula anterior fueron: C = 12.011, H = 1.0079 y O = 15,999 (IUPAC, 1984; con base en $^{12}\text{C} = 12.000$).

Esta fórmula se deduce del hecho, ampliamente constatado, de que el DIL responde únicamente a los iones generados por la combustión de los grupos moleculares C-H de los EMAG. Se ha comprobado que este detector no responde a los grupos moleculares C=O. Estos hechos explican que al número de átomos de carbono del EM se le reste la unidad, pues, los EM presentan un único grupo C=O. Esto es expresado por Ackman y Sipos diciendo que se presenta una deficiencia en átomos de carbono igual a la unidad.

Así, por ejemplo, si con esta fórmula calculamos los FRRT de los diferentes EMAG utilizando el EM del C20:0 como referencia ($FRRT = 1$) veremos que los EMAG con cadena más corta que el C20:0 presentaran FRRT superiores a la unidad, que aumentarían progresivamente con el acortamiento la longitud de la cadena. Esto es producto de la disminución progresiva del contenido relativo en C-H de la molécula que implica una disminución de la respuesta frente al DIL.

No obstante, esta fórmula no es válida para los EMAG de cadena corta con número de átomos de carbono ≤ 8 . Para estos AG Ackman y Sipos (1964b) observaron que la deficiencia en átomos de carbono a aplicar en la fórmula, para que los FRRT fueran iguales a los FRRE, era superior a la unidad y se encontraba entre 1.1 y 1.5 en función de los AG.

De los resultados de la tabla 3 se desprende que la linealidad es buena para los diferentes EMAG que hemos ensayado. Por otro lado, en esta tabla se puede apreciar que los FRRE van aumentando con el TR cosa que no sucede con los FRRT que presentan una tendencia totalmente opuesta. Los hechos de que en nuestro estudio se hayan observado las diferentes precauciones reflejadas en la bibliografía para eliminar los errores sistemáticos y de que, así y todo, los FRRE difieran de los FRRT hacen pensar en la discriminación, difícil de evitar totalmente al trabajar con partición, como causa de esta diferencia. La propuesta de la discriminación como causa de esta diferencia se realiza en base a que el aumento de los FRRE de los EMAG guarda un cierto paralelismo con el aumento en la longitud de su cadena y, por tanto, con el aumento de su punto de ebullición. Esto sucede cuando estos FRRE teóricamente deberían disminuir al presentar cada vez, los EMAG, mayor respuesta frente al detector. La explicación de esta contradicción se encuentra en la discriminación existente, entre los EMAG con bajo punto de ebullición y alto punto de ebullición, en el momento de entrar en la cabeza de columna. Los EMAG a medida que aumenta su punto de ebullición entran menos cuantitativamente en la columna. De ahí, la aparente disminución en la respuesta de los EMAG frente al DIL, a medida que aumenta su punto de ebullición, y su consecuente aumento en los FRRE (figura 3). En un trabajo de Eder *et al.* (1991), para los FRRE calculados a partir de la inyección con partición, también intentando evitar los errores sistemáticos, se observa una tendencia muy parecida a la de nuestros resultados, debida, según los autores, a la discriminación. No obstante, en nuestro estudio, en comparación con el de Eder *et al.* (1991), el CV de los FRRE es menor y su similitud con los FRRT mayor.

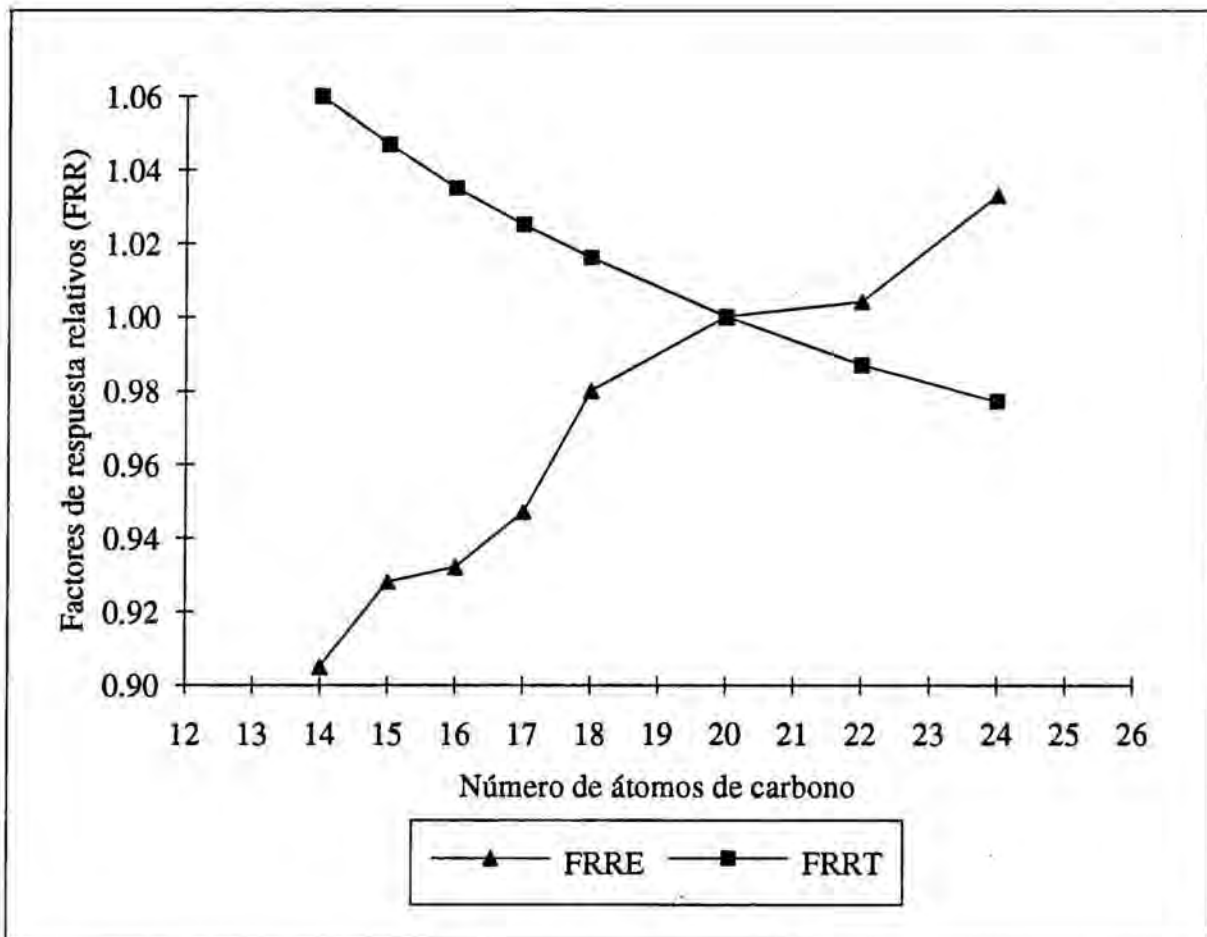


Figura 3-Evolución de los factores de respuesta relativos empíricos (FRRE) respecto a los factores de respuesta relativos teóricos (FRRT) para la serie de los ácidos grasos saturados (en forma de éster metílico).

Como conclusión podemos decir que, al trabajar con la técnica de inyección con partición es muy difícil evitar la discriminación de forma absoluta. También podemos concluir que cuando se trabaja con esta técnica la aplicación de los FRRE para corregir el error producido por la discriminación es correcta, teniendo en cuenta que no está al alcance de todos los laboratorios poseer sistemas de inyección con PTV o de introducción directa de la muestra en cabeza de columna, sistemas en los cuales la discriminación no es problema. Asimismo, asumimos que los FRRE obtenidos en nuestro estudio son específicos para él y no deben ser aplicados indiscriminadamente.

Por todas estas razones, los FRR que se utilizaron, para corregir el área que nos da el integrador y obtener la normalización interna corregida (NIC), fueron los empíricos. La no disponibilidad de patrones del C22:5 n-6 y del C22:5 n-3 para calcular sus FRRE nos llevó a utilizar como FR, para los EM de estos 2 AG, a la media entre los FRRE de los 2 EMAG, cromatográficamente anterior y posterior a cada uno de ellos, de los que si se disponía de patrones. En este caso al presentar el EM del C22:5 n-6 y el del C22:5 n-3 picos cromatográficos colindantes su FR se consideró igual y se obtuvo de la media entre los FRRE de los EM del C22:4 n-6 y del C22:6 n-3.

3.2.COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DEL HUEVO FRESCO.

La composición media en AG del total de huevos analizados (n = 46) figura en la tabla 4, expresada como normalización interna corregida (NIC) en ‰ y en mg de AG/100 g de huevo (fracción comestible). Los resultados en mg de AG sobre 100 g de huevo (fracción comestible) se obtuvieron a partir de la siguiente fórmula usada en varias tablas de composición de alimentos (Fondation Française pour la Nutrition 1987; Paul y Southgate, 1988):

$$\text{mg de AG/100 g alimento} = \% \text{ Lípidos totales} \cdot F \cdot \text{‰ AG}$$

% Lípidos totales = porcentaje de materia lipídica que presenta la fracción comestible del alimento.

F = factor de que permite obtener a partir de la materia lipídica del alimento su contenido en AG. Este factor tiene en cuenta que en la materia lipídica los AG, mayoritariamente, no se encuentran libres, sino combinados con otras moléculas formando glicéridos y FL. Además el factor también considera que la materia lipídica contiene compuestos insaponificables. El factor propuesto por Posati *et al.* (1975) para el huevo tiene un valor de 0.83.

‰ AG = concentración relativa de AG en tanto por mil sobre AG totales.

De esta forma, la fórmula que utilizamos en nuestro caso fue:

$$\text{mg de AG/100 g de huevo} = \% \text{ Lípidos totales} \cdot 0.83 \cdot \text{‰ AG}$$

‰ AG = concentración relativa media de AG en ‰ procedente de la NIC.

El valor de % lípidos totales del huevo utilizado en la fórmula anterior es de 11.14. Este valor proviene de la media de los valores de % de lípidos totales de la fracción comestible

del huevo, reflejados en diferentes tablas de composición de alimentos (Fondation française pour la nutrition, 1991; Paul y Southgate, 1988; Scherz y Senser, 1989; USDA, 1976).

Estos valores de los diferentes AG expresados en mg sobre 100 g de huevo (fracción comestible) son muy útiles para su aplicación en estudios de nutrición y dietética.

Tabla 4-Composición media en AG del total de muestras analizadas expresada como normalización interna corregida (NIC) y en mg AG/100 g de huevo (fracción comestible).

Ácido graso	NIC ^a	AG mg/100g ^b
Saturados		
C12:0	0.10	0.95
C14:0	3.12	28.87
C15:0	0.92	8.52
C16:0	217.92	2014.96
C17:0	3.24	29.92
C18:0	81.13	750.18
C20:0	0.24	2.17
C22:0	0.16	1.44
C24:0	0.10	0.96
Total	306.93	2837.96
trans-Monoenos		
C16:1 n-7t	1.37	12.66
C18:1 n-9t	5.76	53.24
Total	7.13	65.90
cis-Monoenos		
C14:1 n-5	0.43	3.99
C16:1 n-7	22.36	206.75
C18:1 n-9	419.50	3878.77
C18:1 n-7	17.11	158.20
C20:1 n-9	2.52	23.25
C22:1 n-9	0.13	1.15
C24:1 n-9	0.10	0.90
Total	462.14	4273.01
n-6 Polinsaturados		
C18:2 n-6	170.20	1573.72
C18:3 n-6	1.08	9.95
C20:2 n-6	1.96	18.15
C20:3 n-6	1.66	15.36
C20:4 n-6	20.33	187.95
C22:4 n-6	2.62	24.23
C22:5 n-6	4.94	45.71
Total	202.79	1875.07
n-3 Polinsaturados		
C18:3 n-3	6.31	58.33
C20:5 n-3	0.31	2.90
C22:5 n-3	2.18	20.18
C22:6 n-3	12.24	113.21
Total	21.05	194.62
n-6/n-3 Ratio	9.64^c	9.64^c

^a Normalización interna corregida (‰) (valores medios, n = 46).

^b mg de ácido graso en 100 g de huevo fresco (fracción comestible).

^c Valor procedente de dividir el valor medio del total de n-6 polinsaturados entre el valor medio del total n-3 polinsaturados.

Una amplia revisión bibliográfica, realizada en torno a la composición en AG del huevo, nos ha permitido comprobar que la composición que damos en la tabla 4 es una de las más extensas que se han descrito hasta el momento. Esta composición representa una contribución al establecimiento de los niveles de los siguientes AG en el huevo: C12:0, C15:0, C17:0, C24:0, C16:1 n-7t, C18:1 n-9t, C14:1 n-5, C18:1 n-7, C22:1 n-9, C24:1 n-9, C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:4 n-6 y C22:5 n-6. Estos AG se encuentran tan solo en algunas de las composiciones revisadas y se puede considerar que sus niveles todavía no están bien establecidos. Algunos de estos AG son PI y, aunque se encuentran en baja proporción en el huevo, influyen con especial relevancia sobre la estabilidad oxidativa de su fracción lipídica, así como sobre su valor nutricional.

Como puede verse en la tabla 4, la composición media en AG del huevo presenta una elevada proporción de AGPI (22.39%) sobre todo teniendo en cuenta que se trata de un alimento de origen animal. Las proporciones medias de AG *cis*-monoeno y AGS fueron de 46.21 y 30.69% respectivamente. El 0.71% restante correspondió al contenido de AG *trans*-monoeno. La elevada insaturación del huevo condiciona la estabilidad oxidativa de su fracción lipídica, menor que la que presentan el resto de grasas de origen animal.

A partir de la revisión bibliográfica, también se observó que algunos autores describían la presencia de AG en el huevo que no se determinaron en nuestro estudio (tabla 5), si bien cabe señalar que en todos los casos se presentaron en cantidades bajas y también que su presencia podría explicarse como consecuencia de la influencia de diferentes factores, tales como, metodología analítica utilizada, tipo de alimentación y otros factores de producción.

Tabla 5-Ácidos grasos que no se han determinado pero que según algunos autores se hallan presentes en el huevo fresco.

Referencia	Ácido graso
Cotterill <i>et al.</i> , 1977	C8:0 y C10:0
Christie <i>et al.</i> , 1991	C16:1 n-5
Oshima y Koizumi, 1991	C17:2 n-8, C20:1 n-7 y C21:5 n-3
Simopoulos y Salem, 1989 y 1992	C20:3 n-3

Por otro lado, haciendo referencia a los AGPI, y desde un punto de vista nutricional, cabe destacar la presencia considerable de AG de la serie n-3 entre los cuales destacan el C18:3 n-3 y el *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (ADH, C22:6 n-3) que se presentan, respectivamente, en proporciones del 0.63% y del 1.22%. El contenido de ADH es de especial relevancia teniendo en cuenta que los adultos, y especialmente las personas de la tercera edad, poseen limitada capacidad de elongación y desaturación para convertir el C18:3 n-3 en ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (AEP, C20:5 n-3) y ADH (de Gomez y Brenner, 1975). Más concretamente, Crawford (1976) señaló que la especie humana posee limitada capacidad de delta⁴-desaturación. Esta desaturación constituye el último paso en la síntesis endógena de ADH a partir de C18:3 n-3. Además, más recientemente, otros autores sugirieron la esencialidad del ADH para el desarrollo de la función visual en recién nacidos con pocas reservas de este ácido. Estos bebés si no eran alimentados con leche materna o fórmulas infantiles enriquecidas en ADH, mediante la adición de aceites de pescado, presentaban anomalía en la función retinal. Además, las dietas ricas en C18:3 n-3 aplicadas a estos bebés daban también como resultado anomalía en dicha función (Uauy *et al.*, 1990). Además, por otra parte, y en referencia al tema, Liu *et al.* (1987) observaron en bebés prematuros un descenso tras el parto de los niveles de ADH presentes en los eritrocitos. Este descenso no se producía si los bebés eran alimentados con leche materna o con fórmulas enriquecidas en ADH. Todos estos hechos apuntan hacia la esencialidad del ADH y dan a la yema de huevo, por su contenido en este ácido, importancia nutricional. Más si se tiene en cuenta que el contenido de ADH en leche materna es tan solo del 0.1-0.3% según Harris *et al.* (1984) y del 0.1-0.4% según Spear *et al.* (1992). En ambos casos este contenido fue calculado sobre el total de AG.

También, haciendo referencia a los AGPI y desde el punto de vista nutricional, es destacable la presencia de AG de la serie n-6, entre los cuales destacan el C18:2 n-6 y el C20:4 n-6, que se presentan respectivamente en proporciones del 17.02 y del 2.03%. En relación con el C20:4 n-6 es interesante plantear la pregunta que se hacen algunos investigadores de si los bebés prematuros poseen la capacidad de elongación y desaturación necesarias para convertir el C18:2 n-6 en C20:4 n-6 (Clandinin *et al.*, 1981).

En razón de todo esto, Simopoulos y Salem (1992) proponen la yema de huevo como

alimento de destete, a partir del primer mes, debido a su alto contenido en AGPI de cadena larga de más de 18 átomos de carbono. En relación con esta posible utilización de la yema de huevo, cabe resaltar que posiblemente evitaría la disminución de C20:4 n-6 que se presenta en los eritrocitos y FL plasmáticos de bebés prematuros al ser alimentados con fórmulas infantiles enriquecidas con aceites de pescado (Carlson *et al.*, 1991). Esta presunción se hace en base a que el huevo es una buena fuente de C20:4 n-6. Además, se ha constatado que, en niños de 1 a 2 años de edad, el C20:4 n-6 presente en los FL plasmáticos es directamente proporcional a la cantidad de huevos presentes en la dieta de estos niños (Carlson *et al.*, 1991).

Cuando hablamos de la utilización del huevo como alimento de destete, lo hacemos tan solo de la yema. Esto es debido a que no se aconseja la administración de clara de huevo a los niños, hasta la edad de 1 año, por las posibles reacciones alérgicas que pueden inducir sus proteínas. Tampoco debemos olvidar, al hablar de la yema, que es buena fuente de proteína y hierro para los niños (Stadelman *et al.*, 1988).

3.3.EL SISTEMA DE EXPLOTACIÓN Y LA DIETA DE LAS PONEDORAS: DOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DEL HUEVO.

3.3.1.COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS EN HUEVOS PROCEDENTES DE DOS SISTEMAS DE EXPLOTACIÓN.

En la tabla 6 se reflejan las composiciones medias en AG de las muestras procedentes de grandes y pequeñas explotaciones. Como se puede observar en la tabla, existen diferencias en la composición de los huevos en función de su procedencia. La aplicación de la prueba de la t de Student-Fisher para grupos independientes nos mostró que algunas de estas diferencias eran estadísticamente significativas (tabla 6). Entre estas diferencias cabe destacar la mayor presencia de ácidos *cis*-monoeno en los huevos de pequeñas explotaciones y de ácidos n-6 polinsaturados en los de grandes explotaciones, lo que confiere desde este punto de vista, una mayor oxidabilidad a la fracción lipídica de los huevos procedentes de grandes explotaciones. Al mismo tiempo, se observa una mayor presencia, no estadísticamente

significativa, de ácidos n-3 polinsaturados en los huevos de pequeña explotación. Este hecho, no obstante, contribuye a que la diferencia para la relación n-6/n-3 entre los dos grupos sea estadísticamente significativa.

Esta diferencia en la relación n-6/n-3 es importante desde un punto de vista nutricional, ya que, según Neuringer y Connor (1986) esta relación debería situarse en la dieta entre 4/1 y 10/1, especialmente durante el embarazo, lactancia e infancia. Esta relación, según Gormley (1987), para la leche humana se sitúa alrededor de 4.8/1. No obstante, en algunos trabajos recientes figuran valores muy superiores para esta relación en esta leche (Uauy *et al.*, 1990; Spear *et al.*, 1992). La recomendación de Neuringer y Connor se cumple para el huevo procedente de pequeña explotación pero no para el huevo de gran explotación. No obstante, la presencia en ambos grupos de cantidades apreciables de ADH, entre sus ácidos n-3 polinsaturados, disminuye la importancia de esta diferencia. Esto es debido a que esta presencia quita relevancia a la competencia por la delta⁶-desaturasa existente entre el C18:2 n-6, presente en proporciones elevadas, y el C18:3 n-3, que se encuentra a bajas proporciones. Este enzima es el primero de la vía metabólica que parte de los 2 AG citados anteriormente y conduce, respectivamente, a C20:4 n-6 y ADH, entre otros. No obstante, es importante señalar que el C18:2 n-6 se presenta en los huevos de pequeña explotación en una proporción significativamente menor que en los huevos de gran explotación. De la misma manera, la media de la proporción de C18:3 n-3 para el grupo de huevos de pequeña explotación es superior a la del grupo de huevos de gran explotación.

3.3.2. INFLUENCIA DE LA DIETA DE LAS PONEDORAS SOBRE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE SUS HUEVOS.

Además, con el fin de estudiar como influía la proporción de pienso, presente en la dieta de las ponedoras, sobre la composición en AG de la fracción lipídica de sus huevos, 15 de las 23 muestras procedentes de pequeñas explotaciones se tomaron de tres granjas en las que se controlaba la dieta de las ponedoras. De estas 15 muestras, 5 procedieron de la granja 1, 5 de la 2 y 5 más de la 3. En estas tres granjas se utilizaba el mismo pienso y las gallinas eran de la misma raza y edad. La composición media (n = 9) de este pienso figura en la tabla 7. Este pienso se sustituyó, de forma creciente de la granja 3 a la 1 (aproximadamente: 3, 40%;

2, 70%; 1, 85%), por una dieta a base de cereales (trigo y maíz), hortalizas (col, acelgas y patatas), forraje y pan remojado.

La composición media ($n = 5$) en AG para los huevos de cada una de las granjas se encuentra en la tabla 8. En esta tabla podemos observar que la composición difiere en función de la granja. La aplicación del análisis de la variancia, para grupos independientes, a cada uno de los AG en función de la granja de procedencia señaló la existencia de diferencias estadísticamente significativas para algunos de estos AG. Para aquellos AG en los que el análisis de la variancia resultó ser estadísticamente significativo se aplicó la prueba de Scheffé para contrastes a "posteriori" ($\alpha = 0.05$). Esto se hizo ya que como conclusión de un análisis de la variancia significativo sólo se puede decir que como mínimo una de las medias difiere del resto. En cambio, mediante la prueba de Scheffé se puede saber que medias difieren de forma estadísticamente significativa entre sí, por medio de contrastes que las comparan 2 a 2 (tabla 9). La aplicación de esta prueba para los AG *trans*-monoenoos totales nos mostró que los huevos de las ponedoras que comían más pienso (granja 3) presentaban, en media, entre un 7.34 ‰ y un 12.20 ‰ más de estos ácidos que los de las ponedoras que comían menos pienso (granja 1); y entre un 2.68 ‰ y un 7.53 ‰ más que los de las ponedoras de la granja 2. Además, los huevos de las ponedoras de la granja 2 presentaban, en media, entre un 2.24 ‰ y un 7.09 ‰ más de AG *trans*-monoenoos totales que los de las ponedoras de la granja 1 (tabla 9). Teniendo en cuenta que los AG *trans* que ingirieron las ponedoras provenían únicamente del pienso, se puede proponer que el contenido en AG *trans* del huevo guarda una cierta relación de proporcionalidad con el contenido en estos ácidos en la dieta de las ponedoras.

Por otro lado, y también gracias a la prueba de Scheffé, se concluyó que los huevos de las ponedoras de la granja 3 presentaban, en media, entre un 44.34 ‰ y un 101.40 ‰ más de C18:2 n-6 que los de la granja 1; y entre un 18.97 ‰ y un 76.03 ‰ más que los de las ponedoras de la granja 2. En cambio, la diferencia en la proporción, para este ácido, entre los huevos de la granja 2 y 1 no resultó ser estadísticamente significativa (tabla 9). En la tabla 7 podemos apreciar que tanto el pienso como algunos de los componentes de la dieta por la que es sustituido presentan una elevada proporción de C18:2 n-6. Por otro lado, a medida que aumenta la proporción de pienso en la dieta de las ponedoras, de una granja a

otra, aumenta también el contenido en C18:2 n-6 de los huevos y su porcentaje de lípidos (extraídos mediante agitación con cloroformo/metanol, 2:1, v/v). Este último aumento, aunque no estadísticamente significativo, es seguramente debido a que el pienso contiene mayor porcentaje de materia lipídica (9.92%) que la dieta por la que es sustituido: trigo 2.00 %, Maíz 3.80 %, col 0.20 %, patatas 0.11 % (Scherz y Senser, 1989); y pan 1.70 % (Paul y Southgate, 1988). Además, teniendo en cuenta este hecho podemos decir que un determinado peso de pienso aporta mayor cantidad de C18:2 n-6 que el mismo peso de trigo, maíz o pan. Esto es debido a que, aunque el C18:2 n-6 se presenta en los 4 alimentos en proporciones similares, el pienso presenta una proporción de materia lipídica considerablemente mayor a la que presentan el trigo, maíz o pan. Por otro lado, ya desde hace muchos años y hasta nuestros días, en multitud de trabajos se ha venido constatando que el aumento de AG monoinsaturados (Donaldson, 1967; Pankey y Stadelman, 1969; Watkins y Elkin, 1992), de C18:2 n-6 y C18:3 n-3 (Cruikshank, 1934; Fisher y Leveille, 1957; Watkins y Elkin, 1992) y de AG de 20 y 22 átomos de carbono con elevado número de insaturaciones (Navarro *et al.*, 1972; van Elswyk *et al.*, 1992) en la dieta de las ponedoras se traducía en un aumento de estos ácidos en los huevos obtenidos. Además, en relación al tema, también se observó que el incremento de C18:2 n-6 en la dieta de las ponedoras, además de implicar un aumento del contenido de este ácido en los huevos obtenidos, iba acompañado de una disminución del contenido del C18:1 n-9 (Cook y Briggs, 1977; Huyghebaert *et al.*, 1991; March y McMillan, 1990; Vahl *et al.*, 1991). De los datos de la tabla 8 se desprende que el aumento, de una granja a otra, en la proporción de C18:2 n-6 presente en sus huevos va acompañado de una disminución en la proporción de C18:1 n-9. Además, en nuestro estudio se observó que este aumento del C18:2 n-6 iba acompañado, a la vez, de una disminución en la proporción de los AG n-3 polinsaturados de más de 20 átomos de carbono.

Esta disminución es especialmente notable en el caso del ADH, ácido del que ya hemos comentado su importancia nutricional. Mediante la aplicación de la prueba de Scheffé se pudo concluir que los huevos de la granja 1 presentan, en media, entre un 0.68 ‰ y un 3.81 ‰ más de ADH que los de la granja 3; y entre un 0.23 ‰ y un 3.36 ‰ más que los de la granja 2. En cambio, la diferencia en la proporción, para este ácido, entre los huevos de la granja 2 y 3 no resultó ser estadísticamente significativa (tabla 9).

También cabe resaltar que la relación n-6/n-3 presentó diferencias estadísticamente significativas en función de la granja de procedencia ($P < 0.0001$) (tabla 8). La posterior aplicación de la prueba de Scheffé nos permitió concluir que la diferencia existente entre esta relación para la granja 1 y para la granja 2 no era estadísticamente significativa. No obstante, esta misma prueba nos llevó a concluir que esta relación para la granja 3 era superior, en media, entre 2.22 y 5.24 unidades a la de la granja 1; y entre 1.52 y 4.54 unidades a la de la granja 2 (tabla 9). Además, el valor medio de la relación n-6/n-3 para las granjas 1 y 2 cumplió las recomendaciones de Neuringer y Connor (1986), cosa que no hizo el valor medio de esta relación para la granja 3.

Tabla 6-Comparación entre la composición en AG, expresada como normalización interna corregida (ρ/ω), de los huevos procedentes de grandes ($n = 23$) y pequeñas explotaciones ($n = 23$).

Ácido graso	Gran explotación	Pequeña explotación	P (IC) ^a
Saturados			
C12:0	0.09	0.12	
C14:0	3.11	3.13	
C15:0	0.94	0.91	
C16:0	218.26	217.59	
C17:0	3.53	2.94*	$6.28 \cdot 10^{-3}$ (0.18÷1.01)
C18:0	82.36	79.91	
C20:0	0.23	0.24	
C22:0	0.14	0.17	
C24:0	0.10	0.11	
Total	308.75	305.12	
trans-Monoenos			
C16:1 n-7t	1.31	1.43	
C18:1 n-9t	5.04	6.48	
Total	6.35	7.91	
cis-Monoenos			
C14:1 n-5	0.44	0.42	
C16:1 n-7	19.74	24.99*	$3.28 \cdot 10^{-3}$ (1.84÷8.67)
C18:1 n-9	407.93	431.07	CS (0.054) ^b
C18:1 n-7	15.59	18.63*	$5.71 \cdot 10^{-5}$ (1.70÷4.40)
C20:1 n-9	2.53	2.51	
C22:1 n-9	0.09	0.16*	$2.57 \cdot 10^{-3}$ (0.03÷0.11)
C24:1 n-9	0.11	0.08	
Total	446.42	477.86*	$8.35 \cdot 10^{-3}$ (8.49÷54.39)
n-6 Polinsaturados			
C18:2 n-6	184.71	155.70*	$2.90 \cdot 10^{-3}$ (10.25÷47.38)
C18:3 n-6	1.12	1.04	
C20:2 n-6	2.12	1.81*	$1.49 \cdot 10^{-2}$ (0.06÷0.56)
C20:3 n-6	1.67	1.65	
C20:4 n-6	20.88	19.78*	$4.51 \cdot 10^{-2}$ (0.02÷2.18)
C22:4 n-6	2.71	2.53	
C22:5 n-6	5.32	4.57	
Total	218.51	187.08*	$1.87 \cdot 10^{-3}$ (12.29÷50.56)
n-3 Polinsaturados			
C18:3 n-3	5.94	6.68	
C20:5 n-3	0.25	0.38*	$3.25 \cdot 10^{-3}$ (0.04÷0.21)
C22:5 n-3	1.84	2.53*	$1.14 \cdot 10^{-2}$ (0.16÷1.21)
C22:6 n-3	11.96	12.53	
Total	19.99	22.11	
Relación n-6/n-3	11.45 ^c	8.62 ^{c*}	$4.08 \cdot 10^{-4}$ (1.34÷4.32)
% Grasa ^d	9.51	9.45	

* Diferencia estadísticamente significativa entre los 2 grupos ($\alpha = 0.05$).

^a P = grado de significación; e IC = intervalo de confianza de la diferencia (95%).

^b CS = diferencia casi significativa ($P < 0.10$), entre paréntesis el grado de significación.

^c Valor medio de la relación n-6/n-3 ($n = 23$).

^d Porcentaje de grasa extraído mediante agitación magnética con cloroformo/metanol (2:1, v/v).

Tabla 7-Composición en AG del pienso y de los componentes de la dieta por la que se sustituyó.

Ácido graso	Pienso ^a	Trigo ^b	Maíz ^b	Col ^b	Patata ^b	Pan ^c
Saturados						
C12:0	0.10					0.7
C14:0	0.39			0.3	0.5	1.6
C16:0	10.59	20.5	13.7	19.5	22.9	23.0
C17:0	0.17					
C18:0	6.08	1.5	2.6	1.9	5.2	5.0
C20:0	0.44		2.2	0.3	1.3	
C22:0	0.55				0.9	
Total	18.32	22.0	18.5	22.0	30.8	30.3
trans-Monoenos						
C16:1 n-7t	0.02					
C18:1 n-9t	3.38					
Total	3.40					
cis-Monoenos						
C16:1 n-7	0.71	1.5	1.1	1.8	0.6	1.1
C18:1 n-9	25.36	14.7	32.0	1.4	2.1	17.7
C18:1 n-7	1.33					
C20:1 n-9	0.36					
Total	27.76	16.2	33.1	3.2	2.7	18.8
Polinsaturados						
C18:2 n-6	48.08	57.8	47.4	17.5	38.9	45.4
C18:3 n-3	2.44	4.0	1.2	57.4	27.6	3.3
Total	50.52	61.8	48.6	74.9	66.5	48.7
% Grasa	4.74 ^d 9.92 ^e	2.00	3.80	0.20	0.11	1.70

^a Composición media en AG expresada como normalización interna corregida en % (n = 9).

^b Datos en % de AG sobre AG totales procedentes de Scherz y Senser (1989).

^c Datos en % de AG sobre AG totales procedentes de Paul y Southgate (1988).

^d Porcentaje de grasa extraído mediante agitación magnética con cloroformo/metanol (2:1, v/v).

^e Porcentaje de grasa extraído siguiendo el método marcado por la legislación española para la determinación de la grasa total (con hidrólisis previa) en piensos (BOE, 1989).

Tabla 8-Composición media (n = 5) en AG, expresada como normalización interna corregida (%/∞), de los huevos procedentes de tres granjas en las que las ponedoras eran alimentadas con dietas en las que difería la proporción de pienso ^a.

Ácido graso	Granja 1	Granja 2	Granja 3	P ^b
Saturados				
C12:0	0.13	0.18	0.07 *	0.0446
C14:0	3.20	3.40	2.60 *	0.0044
C15:0	0.89	1.03	0.73 *	0.0134
C16:0	225.56	233.98	214.02	
C17:0	2.53	2.90	3.27 *	0.0196
C18:0	85.46	82.03	81.40	
C20:0	0.31	0.26	0.27	
C22:0	0.15	0.17	0.19	
C24:0	0.10	0.09	0.14	
Total	318.20	323.94	302.57	
trans-Monoenos				
C16:1 n-7t	0.98	1.56	2.37 *	<0.0001
C18:1 n-9t	4.06	8.15	12.44 *	<0.0001
Total	5.04	9.71	14.81 *	<0.0001
cis-Monoenos				
C14:1 n-5	0.42	0.48	0.34 *	0.0134
C16:1 n-7	26.37	29.49	16.16 *	0.0001
C18:1 n-9	444.54	405.80	391.00 *	0.0026
C18:1 n-7	19.97	19.46	16.26 *	0.0028
C20:1 n-9	2.53	2.37	2.61	
C22:1 n-9	0.10	0.21	0.20	
C24:1 n-9	0.08	0.07	0.14	
Total	493.91	457.79	426.57 *	0.0006
n-6 Polinsaturados				
C18:2 n-6	129.92	155.29	202.79 *	<0.0001
C18:3 n-6	0.89	1.03	1.22	
C20:2 n-6	1.79	1.94	2.22	
C20:3 n-6	1.69	1.65	1.68	
C20:4 n-6	19.85	18.52	20.61 *	0.0411
C22:4 n-6	2.62	2.49	2.42	
C22:5 n-6	4.37	4.81	4.13	
Total	161.14	185.74	235.08 *	0.0001
n-3 Polinsaturados				
C18:3 n-3	4.81	7.61	7.13 *	0.0037
C20:5 n-3	0.53	0.40	0.24 *	0.0008
C22:5 n-3	2.42	2.58	2.07	
C22:6 n-3	13.36	11.57	11.12 *	0.0042
Total	21.12	22.15	20.55	
Relación n-6/n-3	7.69 ^c	8.40 ^c	11.42 ^{c*}	<0.0001
% Grasa ^d	8.56	9.09	9.80	

* Señala la existencia de diferencias estadísticamente significativas.

^a La proporción de pienso aumentó de la granja 1 a la 2 y de la 2 a la 3.

^b P = grado de significación procedente del análisis de la variancia para grupos independientes.

^c Valor medio de la relación n-6/n-3 (n = 5).

^d Porcentaje de grasa extraído mediante agitación magnética con cloroformo/metanol (2:1, v/v).

Tabla 9-Resultados de los contrastes a "posteriori" aplicados para aquellos AG en los que el análisis de la variancia para grupos independientes señaló la existencia de diferencias estadísticamente significativas en función de la granja (prueba de Scheffé, $\alpha = 0.05$)(continúa)^f.

Ácido graso	Granja	Granja 2	Granja 3
C12:0	1	NS ^b	NS
	2		P=0.0446(0.003 ÷ 0.218) ^c
C14:0	1	NS	P=0.0322(0.051 ÷ 1.156)
	2		P=0.0059(0.245 ÷ 1.350)
C15:0	1	NS	NS
	2		P=0.0134(0.063 ÷ 0.522)
C17:0	1	NS	P=0.0196(0.123 ÷ 1.375)
	2		NS
C16:1 n-7t	1	P=0.0283(0.062 ÷ 1.098)	P < 0.0001(0.873 ÷ 1.909)
	2		P=0.0033(0.293 ÷ 1.329)
C18:1 n-7t	1	P=0.0014(1.754 ÷ 6.418)	P < 0.0001(6.046 ÷ 10.710)
	2		P=0.0009(1.960 ÷ 6.625)
Total <i>trans</i> -monoenos	1	P=0.0007(2.237 ÷ 7.094)	P < 0.0001(7.340 ÷ 12.197)
	2		P=0.0003(2.675 ÷ 7.532)
C14:1 n-5	1	NS	NS
	2		P=0.0134(0.030 ÷ 0.244)
C16:1 n-7	1	NS	P=0.0016(4.306 ÷ 16.105)
	2		P=0.0002(7.430 ÷ 19.230)
C18:1 n-9	1	P=0.0260(4.661 ÷ 72.830)	P=0.0032(19.462 ÷ 87.631)
	2		NS

^a La proporción de pienso en la dieta de las ponedoras aumentaba de la granja 1 a la 2 y de la 2 a la 3.

^b La diferencia para este AG entre las medias de los dos grupos no es estadísticamente significativa (NS = no significativa).

^c P = grado de significación del contraste, entre paréntesis figura el intervalo de confianza de este contraste.

Tabla 9-Resultados de los contrastes a "posteriori" aplicados para aquellos AG en los que el análisis de la variancia para grupos independientes señaló la existencia de diferencias estadísticamente significativas en función de la granja (prueba de Scheffé, $\alpha = 0.05$)(continuación)^a.

Ácido graso	Granja	Granja 2	Granja 3
C18:1 n-7	1	NS ^b	P=0.0050(1.200 ÷ 6.205) ^c
	2		P=0.0133(0.692 ÷ 5.669)
Total cis-monoenos	1	P=0.0402(1.594 ÷ 70.641)	P=0.0006(32.819 ÷ 101.865)
	2		NS
C18:2 n-6	1	NS	P<0.0001(44.338 ÷ 101.398)
	2		P=0.0021(18.969 ÷ 76.029)
C20:4 n-6	1	NS	NS
	2		P=0.0411(0.060 ÷ 4.119)
Total n-6 PI ^d	1	NS	P=0.0001(44.063 ÷ 103.822)
	2		P=0.0022(19.467 ÷ 79.226)
C18:3 n-3	1	P=0.0060(0.859 ÷ 4.735)	P=0.0196(0.380 ÷ 4.256)
	2		NS
C20:5 n-3	1	NS	P=0.0008(0.136 ÷ 0.447)
	2		P=0.0471(0.002 ÷ 0.312)
C22:6 n-3	1	P=0.0249(0.229 ÷ 3.359)	P=0.0063(0.676 ÷ 3.810)
	2		NS
Relación n-6/n-3	1	NS	P=0.0001(2.216 ÷ 5.237)
	2		P=0.0005(1.516 ÷ 4.537)

^a La proporción de pienso en la dieta de las ponedoras aumentaba de la granja 1 a la 2 y de la 2 a la 3.

^b La diferencia para este AG entre las medias de los dos grupos no es estadísticamente significativa (NS = no significativa).

^c P = grado de significación del contraste, entre paréntesis figura el intervalo de confianza de este contraste.

^d PI = polinsaturados.

3.3.3. CONCLUSIONES QUE SE DEDUCEN DE LOS ESTUDIOS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS ÁCIDOS GRASOS DETERMINADOS

Finalmente, se realizaron dos estudios de correlación, en donde se incluyeron como variables los diferentes AG determinados y sus totales. De estos dos estudios, uno se realizó utilizando la prueba de Spearman sobre las 15 muestras procedentes de las tres granjas en donde se había controlado la dieta de las ponedoras, mientras que en el otro se trabajó con el coeficiente de correlación de Pearson sobre el total de las 46 muestras.

Los resultados más relevantes del estudio realizado sobre las 15 muestras fueron la existencia de relaciones lineales negativas entre C18:2 n-6 y C16:1 n-7 ($r_s = -0.6071$, $P = 0.0231$), C18:1 n-9 ($r_s = -0.8607$, $P = 0.0013$), C18:1 n-7 ($r_s = -0.7857$, $P = 0.0033$), total de AGMI ($r_s = -0.9214$, $P = 0.0006$), C20:5 n-3 ($r_s = -0.7071$, $P = 0.0081$), C22:5 n-3 ($r_s = -0.6393$, $P = 0.0168$) y total de AGPI n-3 con más de 20 átomos de carbono ($r_s = -0.8786$, $P = 0.0010$); y positivas entre este mismo ácido y C16:1 n-7t ($r_s = 0.9607$, $P = 0.0003$), C18:1 n-9t ($r_s = 0.9214$, $P = 0.0006$) y total de AG *trans*-monoeno ($r_s = 0.9536$, $P = 0.0004$). Los resultados constatados entre paréntesis corresponden, respectivamente, al coeficiente de correlación de Spearman designado por " r_s " y a su grado de significación designado por "P". De estas correlaciones estadísticamente significativas del C18:2 n-6, podemos concluir que el contenido de este ácido en estos huevos es inversamente proporcional al del total de AGMI y al del total de AGPI n-3 con más de 20 átomos de carbono; y directamente proporcional al del total de AG *trans*-monoeno. Esta relación lineal positiva existente entre los contenidos de C18:2 n-6 y los de AG *trans*-monoeno es seguramente debida a que los niveles de estos AG en estos huevos dependen de un factor común que, en este caso, no es otro que la cantidad de pienso ingerida por las ponedoras.

Por otro lado, patrones de correlación muy parecidos se hallaron cuando se trabajó con el total de las 46 muestras, de las cuales 8 no fueron incluidas en el estudio por no haberse cuantificado alguno de los AG. De entre los resultados obtenidos, las relaciones lineales más relevantes fueron las del C18:2 n-6 con los mismos AG que en el estudio anterior, a excepción de con el C20:5 n-3 y con el total de AGPI n-3 de más de 20 átomos de carbono, con los que no se correlacionó, y de con el C18:3 n-3, con el que sí lo hizo. Los coeficientes de correlación de Pearson, con su grado de significación, correspondientes a estas relaciones

lineales del C18:2 n-6 con los diferentes AG fueron: C16:1 n-7 ($r = -0.6155$, $P < 0.0001$), C18:1 n-9 ($r = -0.8312$, $P < 0.0001$), C18:1 n-7 ($r = -0.7660$, $P < 0.0001$), total de AGMI ($r = -0.7538$, $P < 0.0001$), C20:5 n-3 ($r = -0.4714$, $P = 0.0089$), C16:1 n-7t ($r = 0.4247$, $P = 0.0036$), C18:1 n-9t ($r = 0.3308$, $P = 0.0265$), total de AG *trans*-monoeno ($r = 0.3228$, $P = 0.0287$) y C18:3 n-3 ($r = 0.3855$, $P = 0.0089$). Según estas relaciones podemos concluir que en el huevo, un aumento en C18:2 n-6 va acompañado de una disminución en AGMI y C20:5 n-3; y de un aumento en AG *trans* y C18:3 n-3. La relación inversa existente entre el C18:2 n-6 y algunos AGMI y su total está íntimamente ligada a la también relación inversa observada entre el total de AGPI y el total de AGMI ($r = -0.7332$, $P < 0.0001$). Esta última relación, a la vez, esta de acuerdo con el hecho ampliamente constatado de que la dieta de la ponedora influye sobre el contenido de AGI de sus huevos, pero modifica levemente el de AGS. Este hecho se puede observar claramente, en nuestro estudio, a través de los datos de la tabla 6, en donde vemos que la proporción de AGS prácticamente no difiere en función del origen, cosa que si hacen los AGPI y los AGMI. Por otro lado, las relaciones del C18:2 n-6, negativa con el C20:5 n-3 y positiva con el C18:3 n-3, hacen pensar en una posible inhibición por parte del C18:2 n-6 de la síntesis en el huevo de AGPI n-3 de más de 20 átomos de carbono a partir de C18:3 n-3, esta hipótesis vendría corroborada además por las relaciones observadas en este sentido al trabajar con las 15 muestras y por los coeficientes de correlación negativos, aunque no significativos, existentes entre C18:2 n-6 y los siguientes AG: C22:5 n-3 ($r = -0.1698$), C22:6 n-3 ($r = -0.1159$), total AGPI n-3 con más de 20 átomos de carbono ($r = -0.1593$). Además cuando se trabajó con las 15 muestras los coeficientes de correlación de Spearman, no significativos, existentes entre C18:2 n-6 y C22:6 n-3 y C18:3 n-3 fueron, respectivamente, -0.2464 y 0.4786 . No obstante, la comprobación de esta hipótesis estaría sujeta a la realización de un estudio en donde se controlara el aporte a las ponedoras de C18:2 n-6, C18:3 n-3 y AGPI n-3 de más de 20 átomos de carbono. Otra relación observada para el total de las muestras fue la del C18:2 n-6 con los dos AG *trans* cuantificados y con su total, la explicación de esta relación se podría encontrar en los piensos que, de forma general, constituyen el mayor aporte de C18:2 n-6 y AG *trans* a las ponedoras.

4. CONCLUSIONES GLOBALES.

- La causa de la diferencia existente entre los factores de respuesta relativos calculados experimentalmente y los factores de respuesta relativos teóricos es la discriminación, difícilmente evitable cuando se trabaja con partición. Los factores de respuesta relativos calculados en nuestro estudio dependen de las condiciones cromatográficas utilizadas y son específicos para él. Estos factores se utilizan para corregir el error a que da lugar la discriminación.
- La composición en AG obtenida en nuestro trabajo representa una contribución al establecimiento de los niveles de una serie de AG poco estudiados en el huevo. Algunos de estos AG son PI y, aunque se encuentran en baja proporción en el huevo, influyen con especial relevancia sobre la estabilidad oxidativa de su fracción lipídica, así como sobre su valor nutricional.
- El sistema de explotación es uno de los factores que influyen en la variabilidad de la composición en AG del huevo, afectando al valor nutricional y oxidabilidad de la fracción grasa de este alimento. La relación n-6/n-3 es más favorable, desde el punto de vista nutricional, para los huevos procedentes de pequeñas explotaciones que para los procedentes de grandes. Los huevos procedentes de grandes explotaciones presentan mayor contenido en AGPI que los huevos procedentes de pequeñas explotaciones, lo que confiere, desde este punto de vista, una mayor oxidabilidad a su fracción grasa.
- La dieta de las ponedoras es otro de los factores que influyen en esta variabilidad y también afecta al valor nutricional y oxidabilidad de la fracción lipídica del huevo. Un aumento en la proporción de pienso de la dieta provoca, entre otros, los siguientes cambios de composición: aumento de los AG *trans*-monoeno y aumento del C18:2 n-6 acompañado de una disminución en C18:1 n-9 y en AG n-3 PI de más de 20 átomos de carbono. Estos cambios afectan a la relación n-6/n-3 que resulta ser menos apropiada a medida que aumenta la proporción de pienso en la dieta. Según esto, la oxidabilidad de la fracción lipídica del huevo también aumenta con la proporción de pienso

- Los estudios de correlación entre los distintos AG determinados dieron lugar, de forma global, a las siguientes conclusiones: un aumento de C18:2 n-6 en el huevo va acompañado de una disminución en AGMI y AGPI n-3 de más de 20 átomos de carbono y de un aumento en C18:3 n-3 y AG *trans*-monoenos. La relación inversa existente entre C18:2 n-6 y los AGMI se relaciona con el mantenimiento de la proporción de AGI y AGS en el huevo, a pesar de que varíe la dieta de las ponedoras. La relación directa del C18:2 n-6 con el C18:3 n-3 e inversa con los AGPI de más de 20 átomos de carbono se relaciona con la capacidad de este ácido para inhibir la síntesis de AGPI n-3 de más de 20 átomos de carbono a partir del C 18:3 n-3. La relación lineal positiva existente entre los contenidos de C18:2 n-6 y los de AG *trans*-monoenos es seguramente debida a que los niveles de estos AG en el huevo dependen de un factor común que, en este caso, no es otro que la cantidad de pienso ingerida por las ponedoras.

5. BIBLIOGRAFÍA.

Ackman, R.G. y Sipos, C.J. (1964a). Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **41**, 377-378.

Ackman, R.G. y Sipos, C.J. (1964b). Flame ionization detector response for the carbonyl carbon atom in the carboxyl group of fatty acids and esters. *J. Chromatogr.* **16**, 298-305.

Albertyn, D.E., Bannon, C.D., Craske, J.D., Hai, N.T., O'Rourke, K.L. y Szonyi, C. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. I. Optimization of flame-ionization detectors with respect to linearity. *J. Chromatogr.* **247**, 47-61.

Badings, H.T. y de Jong, C. (1988). Analysis of fatty acid methyl esters (FAME) with high accuracy and reliability. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 659 (carta).

Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L. y O'Rourke, K.L. (1982a). Analysis of fatty acid methyl esters with accuracy and reliability. III. Literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. *J. Chromatogr.* **247**, 71-89.

Bannon, C.D., Craske, J.D., Felder, D.L., Garland, I.J. y Norman, L.M. (1987). Analysis of fatty acid methyl esters with accuracy and reliability. VI. Rapid analysis by split injection capillary gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **407**, 231-241.

Bannon, C.D., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L. y O'Rourke, K.L. (1982b). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride-methanol. *J. Chromatogr.* **247**, 63-69.

- Bannon, C.D., Craske, J.D. y Hilliker, A.E. (1985). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 1501-1507.
- Bannon, C.D., Craske, J.D. y Hilliker A.E. (1986). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. V. Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 105-110.
- Bayer, E., y Liu, G.H. (1983). New split injection technique in capillary columns gas chromatography. *J. Chromatogr.* **256**, 201-212.
- BOE. (1989). Métodos oficiales de análisis de alimentos para animales (piensos) y sus primeras materias. Orden 12209/1989 de 23 de mayo. *BOE 128 de 30 de mayo de 1989*, 16023-16026.
- Carlson, S.E., Cooke, R.J., Rhodes, P.G., Peeples, J.M., Werkman, H. y Tolley, E.A. (1991). Long-term feeding of formulas high in linolenic acid and marine oil to very low birth weight infants: phospholipid fatty acids. *Pediatr. Res.* **30**, 404-412.
- Clandinin, M.T., Chappell, J.E. y Heim, T. (1981). Do low weight infants require nutrition with elongation-desaturation products of essential fatty acids?. *Prog. Lipid. Res.* **20**, 901-904.
- Cook, F. y Briggs, G.M. (1977). Nutritive value of eggs. En *Egg science & technology* (W.J. Stadelman y O.J. Cotterill, Ed.). p. 99-100. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.
- Cotterill, O.J., Marion, W.W. y Naber, E.C. (1977). A nutrient re-evaluation of shell eggs. *Poult. Sci.* **56**, 1927-1934.
- Craske, J.D. y Bannon, C.D. (1987). Gas liquid chromatography analysis of the fatty acid composition of fats and oils: a total system for high accuracy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 1413-1417.
- Crawford, M.A. (1976). Lipids and development of the human brain. *Biochem. Soc. Trans.* **4**, 231-233.
- Cruickshank, E.M. (1934). Studies in fat metabolism in the fowl. 1. The composition of the egg fat and depot fat of the fowl as affected by the ingestion of large amounts of different fats. *Biochem. J.* **28**, 965-977.
- Christie, W.W. (1990). The preparation of derivatives of fatty acids. En *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. p.66-74. The oily press Ltd., Ayr, Escocia, Reino Unido.
- Christie, W.W., Nikolova-Damyanova, B., Laakso, P. y Herslof, B. (1991). Stereospecific analysis of triacyl-*sn*-glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerol derivatives by high-performance liquid chromatography on silica. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 695-701.
- Chrompack. (1988). Fatty acid methyl ester analysis. *Chrompack applications*. Ref. 501249.

- De Gomez, I.N.T y Brenner, R.R. (1975). Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic and stearic acids by human liver microsomes. *Lipids* **10**, 315-317.
- Donaldson, W.E. (1967). Lipid composition of chick embryo and yolk as affected by stage of incubation and maternal diet. *Poult. Sci.* **46**, 693-697.
- Eder, K., Reichlmary-Lais, A.M. y Kirchgessner, M. (1991). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters: avoiding discrimination by programmed temperature vaporizing injection. *J. Chromatogr.* **588**, 265-272.
- Fisher, H. y Leveille, G.A. (1957). Observations on the cholesterol, linoleic and linolenic acid content of eggs as influenced by dietary fats. *J. Nutr.* **63**, 119-129.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Fondation Française pour la Nutrition. Centre Informatique sur la Qualité des Aliments. Institut National de la Recherche Agronomique. (1987). *Repertoire général des aliments. 1. Table de composition des corps gras.* p. 8-10. Technique et documentation-Lavoisier, París, Francia.
- Fondation Française pour la Nutrition. Centre Informatique sur la Qualité des Aliments. Institut National de la Recherche Agronomique. (1991). *Repertoire général des aliments. Table de composition.* p. 62. Technique et documentation-Lavoisier, París, Francia.
- Gormley, T.R. (1987). Review and assesment of key nutritional issues and of the criteria currently applied for determining the effects of food of plant, animal and marine origin on human health. En *Food, health and the consumer.* p. 54. Elsevier applied science, Londres-Nueva York.
- Grob, K., Jr. y Neukom, H.P. (1979). Pressure and flow changes in vaporizing GC injectors during injections and their impact on split ratio and discrimination of sample components. *J. High Resolut. Chomatogr. Chomatogr. Commun.* **2**, 563-569.
- Grundy, S.M. y Denke, M.A. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J. Lipid Res.* **31**, 1149-1172.
- Gunstone, F.D. y Herslöf, B.G. (1992). *A lipid glossary.* The oily press Ltd., Ayr, Escocia, Reino Unido.
- Harris, W. S., Connor, W.E. y Lindsey, S. (1984). Will dietary w-3 fatty acids change the composition of human milk. *An. J. Clin. Nutr.* **40**, 780-785.
- Hayes, K.C., Pronczuk, A., Lindsey, S., y Diersen-Shade, D.(1991). Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, 16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in nonhuman primates. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 491-498.
- Hegsted, D.M., Mcgandy, R.B., Myers, M.L., y Stare, F.J. (1965). Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **17**, 281-295.

- Hopkins, P.N. (1992). Effects of dietary cholesterol on serum cholesterol: a meta-analysis and review. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 1060-1070.
- Huyghebaert, G., de Munter, G., de Groote, G. y Moermans, R.J. (1991). Effect of dietary manipulations on egg fatty acid profile. En *Quality of poultry products. II. Eggs and egg products* (A. Oosterwoud y A.W. de Vries, Ed., procedente del 4th European symposium on the quality of eggs and egg products). p. 279-283. Spelderholt centre for poultry research and information services, Beekbergen, Holanda.
- IUPAC. (1984). Atomic weights of the elements 1983. *Pure Appl. Chem.* **56**, 653-674.
- Jennings, W.G. (1975). Gas inlet splitter for gas chromatography *J. Chromatogr. Sci.* **13**, 185-187.
- Keys, A., Anderson, J.T. y Grande, F. (1965). Serum cholesterol response to changes in the diet: II. The effect of cholesterol in the diet. *Metabolism* **14**, 759-765.
- Khosla, P., y Hayes, K.C. (1992). Comparison between the effects of dietary saturated (16:0), monounsaturated (18:1), and polyunsaturated (18:2) fatty acids on plasma lipoprotein metabolism in cebus and rhesus monkeys fed cholesterol-free diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 51-62.
- Liu, C-C.F., Carlson, S.E., Rhodes, P.G., Rao, V.S. y Meydrecht, E.F. (1987) Increase in plasma phospholipid docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids as a reflection of their intake and mode of administration. *Pediatr. Res.* **22**, 292-296.
- March, B.E. y McMillan, C. (1990). Linoleic acid as a mediator of egg size. *Poult. Sci.* **47**, 1296-1302.
- Navarro, J.G., Saavedra, J.C., Borie, F.B. y Caiozzi, M.M. (1972). Influence of dietary fish meal on egg fatty acid composition. *J. Sci. Food Agric.* **23**, 1287-1292.
- Neuringer, M. y Connor, W.E. (1986). n-3 Fatty acids in the brain and retina: evidence of their essentiality. *Nutr. Rev.* **44**, 285-294.
- OCDE. (1988). *Food Consumption Statistics 1976-1985*. Service des publications de l'Organisation pour la Coopération et Développement Économique, Paris, Francia.
- Oshima, T. y Koizumi, C. (1991). Selected ion monitoring gas chromatography/mass spectrometry of 1,2-diacylglycerol *tert*-butyldimethylsilyl ethers derived from glycerophospholipids. *Lipids* **26**, 940-947.
- Pankey, R.D. y Stadelman, W.J. (1969). Effect of dietary fats on some chemical and functional properties of eggs. *J. Food Sci.* **34**, 312-317.
- Paul, A.A. y Southgate, D.A.T. (1988). McCance and Widdowson's *The composition of foods*. p. 15-17, 290. Her Majesty's stationery office, Londres y Elsevier/North-Holland biomedical press, Amsterdam-Nueva York-Oxford.

- Posati, L.P., Kinsella, J.E. y Watt, B.K. (1975). Comprehensive evaluation of fatty acids in foods. III. Eggs and egg products. *J. Amer. Diet. Ass.* **67**, 111-115.
- Pyörälä, K. (1987). Dietary cholesterol in relation to plasma cholesterol and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 1176-1184.
- Richardson, D.I.S. (1992). Situation and trends in egg international industry. *Int. Egg Market Rev.* **49**, 1-4 y 26-27.
- Rudel, L.L., Haines, J.L., y Sawyer, J.K. (1990). Effects on plasma lipoproteins of monounsaturated, saturated, and polyunsaturated fatty acids in the diet of African green monkeys. *J. Lipid Res.* **31**, 1873-1882.
- Scherz, H. y Senser, F. (1989). Souci, Fachmann and Kraut *Food composition and nutrition tables 1989/90*. p. 124, 459-460, 485-486, 517-518, 542-544, 642-643. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, Alemania.
- Sigma Química. (1993). *Catalogo de reactivos bioquímicos y orgánicos para la investigación y el diagnóstico*. p. 1740-1741. Sigma-Aldrich química S.A., Madrid, España.
- Simopoulos, A.P. y Salem, N. Jr. (1989). n-3 Fatty acids in eggs from range-fed Greek chickens. *N. Engl. J. Med.* **321**, 1412 (carta).
- Simopoulos, A.P. y Salem, N. Jr. (1992). Egg yolk as a source of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 411-414.
- Small, D.M., Craven, B.M., Lange, Y. Shipley, G.G. y Steiner, J. (1986). Appendix III. En *Handbook of lipid research. 4. The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids* (D.J. Hanahan, Ed.). p. 587-601. Plenum press, Nueva York y Londres.
- Spear, M.L., Hamosh, M., Bitman, J. y Wood, D.L. (1992). Milk and blood fatty acid composition during two lactations in the same woman. *Am. J. Clin. Nutr.* **56**. 65-70.
- Stadelman, W.J., Olson, V.M., Shemwell, G.A. y Pasch, S. (1988). Nutritional value of eggs. En *Egg and poultry-meat processing*. p. 20. Ellis Hordwood, Londres Inglaterra; y VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Alemania y Nueva York, EUA.
- Uauy, R.D., Birch, D.G., Birch, E.E., Tyson, J.E. y Hoffman D.R. (1990). Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates. *Pediatr. Res.* **28**, 485-492.
- USDA. (1976). *Composition of foods: dairy and egg products raw-processed-prepared. Handbook 8-1*. USDA, Research service, Washington, DC, EUA.

Vahl, H.A., Stappers, H.P. y Veen, W.A.G. (1991). Nutritional influences on the fatty acid composition and the cholesterol content of eggs. En *Quality of poultry products. II. Eggs and egg products* (A. Oosterwoud y A.W. de Vries, Ed., procedente del 4th European symposium on the quality of eggs and egg products). p. 223-231. Spelderholt centre for poultry research and information services, Beekbergen, Holanda.

Van Elswyk, M.E., Sams, A.R. y Hargis, P.S. (1992). Composition, functionality, and sensory evaluation of eggs from hens fed dietary menhaden oil. *J. Food Sci.* **57**, 342-344.

Watkins, B.A. y Elkin, R.G. (1992). Dietary modulation of oleic and stearic acids in egg yolks. *J. Food Comp. Analysis* **5**, 209-215.

Willett, J.E. (1987). Quantitative analysis by gas chromatography. En *Gas chromatography*. p. 184. John Wiley & Sons, Chichester-Nueva York-Brisbane-Toronto-Singapur.

Volmer, M., Meiborg, G. y Muskiet, F.A.J. (1988). Simultaneous capillary gas chromatographic profiling of medium-and long-chain fatty acid methyl esters with split injection. Correction for injection-related discrimination by the "bracketing" method. *J. Chromatogr.* **434**, 385-394.

IV.A.3. DETERMINACIÓN SELECTIVA DEL CONTENIDO DE COLESTEROL EN EL HUEVO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.

1. INTRODUCCIÓN.	213
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	214
1. Muestras.	214
2. Material y reactivos.	215
3. Extracción de la fracción lipídica.	215
4. Saponificación en frío.	216
5. Determinación cromatográfica.	217
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	218
1. Comprobación de la no oxidación del colesterol a lo largo del método analítico.	218
2. Caracterización del método analítico.	218
1. Selectividad del método.	218
2. Linealidad de la respuesta y factor de respuesta relativo del colesterol frente al detector de ionización de llama.	221
3. Determinación de la precisión.	222
4. Recuperación del método analítico.	223
3. Contenido de colesterol en el huevo fresco y congelado.	225
4. BIBLIOGRAFÍA.	226

1.INTRODUCCIÓN.

A pesar de que las repercusiones de la dieta y sus desequilibrios en la salud humana es un tema de creciente interés entre los consumidores, existen grandes dificultades para que éstos puedan utilizar datos objetivos, tanto en el aspecto de la composición de los alimentos, como en el de sus efectos perjudiciales. En relación con el huevo, su contenido en colesterol es el factor clave que está llevando a una modificación importante de su papel en la dieta, debido a las recomendaciones de los diferentes organismos nacionales e internacionales (European Atherosclerosis Society, 1987; National Institute of Health, 1985; OMS, 1982), en cuanto a la disminución de la ingesta de colesterol, para intentar frenar el gran incremento en la incidencia de las enfermedades cardiovasculares. En las últimas décadas, muchos estudios parecen establecer una clara influencia de la grasa de la dieta en el desarrollo de estas enfermedades (Armstrong *et al.*, 1975; Keys *et al.*, 1986; López *et al.*, 1966; Masironi, 1970; Stamler *et al.*, 1970; Ulbricht y Southgate, 1991). Sin embargo, dichos estudios sugieren que el efecto del colesterol ingerido queda minimizado por un buen equilibrio de la composición grasa de la dieta, en base a la relación $AGS/AGMI + AGPI$ (Edington *et al.*, 1987; Kestin *et al.*, 1989; McNamara, 1990; Pyörälä, 1987). El huevo se encuentra entre los alimentos con una fracción grasa equilibrada en cuanto a ácidos grasos, con una relación $AGPI/AGS$ muy favorable. La mayoría de los trabajos recientes en este campo (Oh y Miller, 1985; Schonfeld *et al.*, 1982) observan un descenso del colesterol plasmático a medida que aumenta la relación $AGPI/AGS$ de la dieta, incluso con elevadas ingestas diarias de colesterol, administrado en forma de huevo. En este mismo sentido, Berner *et al.* (1991) señalan que no se observan incrementos significativos en la concentración de colesterol plasmático en ancianos que consumían dos huevos diarios.

No obstante, la mayoría de estudios y recomendaciones han conducido a una cierta colesterofobia y, en consecuencia, a una disminución del consumo de huevos en los países desarrollados. En España, el consumo de huevos ha pasado de 326 huevos/año por persona en 1976 a 234 en 1991 y estas cifras de consumo todavía son menores en el conjunto de países de la CEE, que presentaron un consumo global de 217 huevos/año por persona en 1991 (OCDE, 1988; Richardson, 1992).

Estas consideraciones apuntan la necesidad de disponer de valores de colesterol que resulten fiables. En este sentido, cabe señalar que el contenido de colesterol de los alimentos es uno de los más controvertidos, en especial debido a las técnicas analíticas utilizadas en su determinación. Por esta razón, existe una importante dispersión en las cifras de colesterol dadas por los diferentes autores y "tablas de composición de alimentos". En un trabajo de Beyer y Jensen (1989) se demuestra que los métodos colorimétricos, usados muy frecuentemente, dan contenidos de colesterol en el huevo entre un 26 y un 46% más altos que los métodos cromatográficos. El mismo tipo de resultados fueron obtenidos por Ulbercht y Reich (1992), en la comparación del contenido de colesterol determinado por diferentes métodos analíticos (colorimétricos y cromatográficos) en diversos alimentos. En resumen, podemos concluir que existe una sobrestimación significativa del contenido de colesterol en muchos alimentos y que debería imponerse una mayor implantación del uso de métodos cromatográficos (CG y CLAE) para la determinación exacta del colesterol. Como demuestra un trabajo de Marshall *et al.* (1989), esta sobrestimación de contenidos no es en absoluto despreciable, pues, el contenido global de colesterol en diversas dietas dependía de la forma en que se obtenía este valor. Así, cuando el valor fue determinado por CG representaba un 75% del valor calculado a través del uso de "tablas de composición de alimentos" y, tan solo, un 50% del valor obtenido colorimétricamente.

De esta forma nuestro objetivo fue la determinación del contenido de colesterol en muestras comerciales de huevo fresco y congelado, empleando la CG, mediante un método analítico selectivo. Además, se prestó especial atención a la posible oxidación del colesterol durante el proceso analítico con lo que se obtuvo un método muy preciso.

2.MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.MUESTRAS.

Se determinó el contenido de colesterol en 10 muestras de huevo fresco y en 6 muestras de huevo congelado. Una de estas muestras de huevo fresco fue utilizada para la determinación de la precisión y recuperación del método analítico.

Preparación de la muestra: En el caso del huevo fresco consistió en cascar 4 huevos y homogeneizarlos en un vaso de precipitados con una batidora.

En el caso del huevo congelado consistió en descongelar un contenedor de 10 kg de huevo completo y homogeneizarlo durante 1 minuto a 20000 rpm mediante un homogeneizador (Ystral electric drive 10/20 3000).

2.2.MATERIAL Y REACTIVOS.

Los diferentes disolventes utilizados fueron de la calidad y procedencia que se indican a continuación: el cloroformo (ACS), el metanol (ACS) y el éter dietílico (ACS) fueron comprados a Panreac, Montplet & Esteban (Barcelona, España); y el acetato de etilo (ACS) y la piridina desecada (máximo 0.01% de agua, para análisis) a Merck (Darmstadt, Alemania).

El resto de reactivos utilizados poseían la calidad y procedencia siguientes: el hidróxido sódico y el sulfato sódico anhidro (ambos para análisis) fueron suministrados por Panreac; y el Sylon BTZ (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida/Trimetilclorosilano/N-trimetilsililimidazol, 3:2:3, para investigación) en ampollas selladas de 0.1 ml por Supelco, Inc. (Bellefonte, PA).

Los patrones de 5α -colestano y colesterol fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y presentaron purezas de 98 % y >99 %, respectivamente. Estos patrones se pesaron en una balanza Sartorius, modelo 2004 MP, que permitía apreciar hasta la centésima de mg. De estos patrones, para su manipulación, se prepararon disoluciones en acetato de etilo. Estas soluciones una vez preparadas se conservaron, por corto espacio de tiempo, encapsuladas en viales de color topacio a - 20 °C.

2.3.EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA.

La extracción se realizó siguiendo el método propuesto por Folch *et al.* (1957), con alguna modificación, según el protocolo que se describe a continuación. Se pesaron aproximadamente 0.6 g de huevo homogeneizado en un Erlenmeyer de 25 ml y sobre ellos

se añadieron 2.5 mg de patrón interno (5α -colestano) y 15 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v). La mezcla se sometió a agitación magnética durante 30 minutos y a continuación se decantó el líquido sobre un embudo con papel de filtro, recogiéndose el filtrado sobre un tubo Pyrex con tapón de rosca con junta de teflon (26x100). Tras ello, el residuo que quedó en el Erlenmeyer se reextrajo con 10 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v) durante 20 minutos. A continuación se filtró la mezcla y se lavó el Erlenmeyer y el residuo del papel de filtro con 5 ml más de la mezcla de disolventes. Estas dos últimas fracciones de filtrado se recogieron sobre el mismo tubo que la anterior, sobre ellas se añadieron 5 ml de agua destilada, el tubo se tapó, se agitó y se centrifugó a 2200 rpm durante 20 minutos. La fase inferior clorofórmica se transfirió mediante una pipeta Pasteur a un matraz color topacio de fondo redondo. Se concentró el extracto hasta aproximadamente 1 ml mediante un evaporador rotatorio de vacío, a una temperatura de 35 °C. Las últimas fracciones de disolvente se eliminaron mediante corriente de nitrógeno y a continuación en un desecador con la aplicación de vacío creciente. Después de 30 minutos en el desecador con un vacío de 750 mm Hg se obtuvo el extracto lipídico.

2.4.SAPONIFICACIÓN EN FRÍO.

Se realizó en base al método propuesto por Park y Addis (1986). Sobre este extracto lipídico se añadieron 10 ml de potasa metanólica 1N y se agitó suavemente el matraz hasta conseguir una única fase homogénea, una vez hecho esto se dejaron transcurrir 20 hr a temperatura ambiente desde la adición de la potasa. Transcurrido este tiempo, la mezcla se pasó cuantitativamente a un tubo (26 x 100) mediante 10 ml de éter etílico y 10 ml de agua destilada. El tubo se tapó, se agitó y una vez separadas las dos fases, la fase etérea superior se pasó a un embudo de decantación mediante una pipeta Pasteur. La fase inferior se reextrajo de forma análoga con 2 fracciones más de 10 ml de éter etílico. Las 2 fracciones se reunieron con la anterior en el embudo de decantación y se lavaron, sucesivamente, con 5 ml de potasa acuosa 0.5 N y 2 fracciones de 5 ml de agua destilada. La solución etérea se filtró sobre sulfato sódico anhidro y se recogió en un matraz de fondo redondo, se lavó el sulfato con pequeños volúmenes del disolvente que también se recogieron sobre el matraz. Se concentró el extracto hasta aproximadamente 1 ml mediante un evaporador rotatorio de vacío, a una temperatura de 30 °C. Las últimas fracciones de disolvente presentes en el

matraz de fondo redondo se eliminaron mediante una leve corriente de nitrógeno y, a continuación, en un desecador con la aplicación de vacío creciente. Después de 30 minutos en el desecador con un vacío de 750 mm Hg, se obtuvo la fracción insaponificable seca.

2.5.DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA.

El insaponificable se redisolvió en 5 ml de piridina y de esta solución se cogieron 50 μ l que se pasaron a un tubo de vidrio Pyrex (10 x 75). En el mismo tubo se añadieron 50 μ l de reactivo silanizante (Sylon BTZ) y la mezcla se mantuvo durante 20 min a temperatura ambiente hasta su inyección. Los derivados silanizados permanecen estables a -20 °C durante unos días (Park y Addis, 1985).

La cromatografía de gases se realizó en un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo Autosystem, equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice (25 m x 0.25 mm d.i.), con 0.13 μ m de espesor de recubrimiento interno de una fase estacionaria de dimetil silicona (CP-Sil 5 CB) de Chrompack (Middelburg, Holanda). Se usó helio como gas portador y las condiciones cromatográficas fueron:

-programas de temperatura de horno:

- 1) de 210 °C hasta 264 °C a 2 °C/min y 1 minuto a 264 °C;
- 2) de 210 °C hasta 290 °C a 6 °C/min y 2.7 minutos a 264 °C;

-temperatura del inyector: 290 °C;

-temperatura del detector: 350 °C;

-relación de partición: 1:30;

-presión de entrada: 15 psi;

-volumen inyectado: 2 μ l.

El programa 1 fue el que se utilizó para comprobar la selectividad del método. Una vez hecha esta comprobación en el resto de determinaciones se empleó el programa 2 que implicaba menor tiempo de análisis.