

Universitat de Lleida

Grado en Nutrición Humana y Dietética

FACULTAD DE MEDICINA

**DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES
ENDÓGENOS LIPOFÍLICOS EN PLASMA Y HDL.
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONSUMO DE
ACEITES DE OLIVA ENRIQUECIDOS EN
COMPUESTOS FENÓLICOS.**

Trabajo de Fin de Grado

Tutora: **M. José Motilva Casado**

Co-tutora: **Laura Rubió Piqué**

Departament Tecnologia d'Aliments

Alumna: **Estefanía Márquez Campos**

Lleida, Junio de 2013

Trabajo de Fin de Grado
Grado en Nutrición Humana y Dietética

“Determinación de antioxidantes endógenos lipofílicos en plasma y HDL. Evaluación del efecto del consumo de aceites de oliva enriquecidos en compuestos fenólicos”.

VºBº M. José Motilva Casado

VºBº Laura Rubió Piqué

En Lleida, a 28 de junio de 2013

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	6
2.1 Dieta Mediterránea y enfermedades cardiovasculares	6
2.2 Efectos beneficiosos del aceite de oliva virgen	7
2.3 Importancia fisiológica de los antioxidantes liposolubles: vitamina E, vitamina A y carotenoides	8
2.4 Importancia de las LDL y HDL en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares	10
3. Hipótesis	12
4. Objetivos de la investigación	14
5. Materiales y métodos	15
5.1 Diseño del estudio	15
5.2 Equipos, material y reactivos	18
5.3 Procedimiento	19
5.3.1 Extracción de los compuestos lipofílicos	19
5.3.2 Análisis cromatográfico	21
5.3.3 Análisis estadístico	24
6. Resultados	25
6.1. Grado de cumplimiento	25
6.2. Efecto de la ingesta de los aceites enriquecidos en los niveles de antioxidantes endógenos lipofílicos en plasma	26
6.3. Efecto de la ingesta de aceites enriquecidos en los niveles de antioxidantes endógenos lipofílicos en HDL	32
7. Discusión	38
8. Conclusión	41
9. Bibliografía	42

1. Resumen

La Dieta Mediterránea posee un papel protector frente al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares gracias a los alimentos que la constituyen, entre los que destaca el aceite de oliva como principal fuente de grasas. La hipótesis de la que se parte en el presente trabajo es que el aceite de oliva enriquecido en compuestos fenólicos podría actuar como nutracéutico modulando el sistema antioxidante endógeno, contribuyendo así en la defensa antioxidante del plasma y de las partículas HDL.

Para comprobar dicha hipótesis se llevó a cabo un estudio de intervención con un diseño de ensayo randomizado cruzado en el que participaron 19 voluntarios cuya dieta fue suplementada durante 21 días con 25 mL de aceite de oliva. Se ensayaron tres tipos de aceite consumidos en crudo: aceite de oliva virgen (VOO) con un contenido en fenoles bajo (80 ppm aproximadamente); aceite de oliva funcional 1 (FOO1), enriquecido con 500 ppm de fenoles propios; y aceite de oliva funcional 2 (FOO2), enriquecido con 250 ppm de fenoles propios y 250 ppm de fenoles del tomillo. Tras el período de intervención (21 días) se recogieron muestras de plasma y HDL para determinar la cantidad de vitaminas liposolubles presentes (retinol, α -tocoferol, luteína y β -criptoxantina). De este modo se pretendió observar el efecto modulador de los compuestos fenólicos sobre la concentración de antioxidantes endógenos del plasma y de las HDL.

Los resultados han mostrado un aumento estadísticamente significativo en la concentración de retinol y α -tocoferol en plasma después de la intervención con FOO1 y FOO2. En cuanto a las HDL, no hubo incrementos estadísticamente significativos en la concentración de ningún compuesto después del periodo de tratamiento. No obstante, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de incremento de retinol y α -tocoferol tras la ingesta de FOO1 y FOO2 con respecto a VOO, y de luteína y β -criptoxantina tras la ingesta de FOO1.

Con estos resultados puede afirmarse que el aceite de oliva enriquecido en compuestos fenólicos puede modular los niveles de antioxidantes lipofílicos en plasma y HDL, pudiendo mejorar junto con otros parámetros la funcionalidad de las HDL. Así, podría justificarse el uso de este tipo de aceites funcionales para prevenir o tratar las enfermedades cardiovasculares.

2. Introducción

2.1 Dieta Mediterránea y enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel mundial. Se estima que en el año 2008 se produjeron 17.3 millones de muertes por esta causa, lo que representaría aproximadamente un 30% de todas las muertes registradas [1].

Desde hace décadas se ha observado que la incidencia de este tipo de enfermedades es menor en los países que rodean el mar Mediterráneo, hecho atribuido principalmente a los hábitos dietéticos característicos de esta zona. Este patrón alimentario se caracteriza por un consumo elevado de verduras, frutas, legumbres, frutos secos, cereales no refinados y aceite de oliva; un consumo moderado-alto de pescado; un consumo moderado de productos lácteos en forma de yogur o queso, y etanol en forma de vino; y un consumo bajo de grasas saturadas, carnes rojas y aves [2].

Los beneficios de la Dieta Mediterránea con respecto a la incidencia de enfermedades cardiovasculares han sido analizados durante las últimas décadas, tanto mediante estudios observacionales como mediante estudios experimentales.

El Estudio de los Siete Países [3], el proyecto HALE [4], el Estudio de Salud de Enfermeras [5] y el estudio EPIC en Grecia [6] son algunos de los estudios observacionales de cohortes más relevantes llevados a cabo en relación a este tema debido, principalmente, a la larga duración de los mismos y al elevado número de individuos analizados. Asimismo, se han llevado a cabo estudios de casos y controles [7,8] que también remarcan el papel protector que posee la Dieta Mediterránea frente al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

En cuanto a los estudios experimentales, cabe destacar el ensayo clínico aleatorio THIS-DIET [9] en el que se destaca la importancia de la Dieta

Mediterránea en lo que se refiere a la disminución del riesgo de padecer cardiopatía coronaria.

2.2 Efectos beneficiosos del aceite de oliva virgen

A pesar de la evidencia existente sobre los múltiples beneficios de la Dieta Mediterránea, todavía se desconocen los mecanismos exactos que intervienen. No obstante, se cree que los compuestos funcionales de los alimentos que caracterizan este patrón alimentario podrían estar relacionados con dichos efectos.

Uno de los componentes característicos de este patrón alimentario es el aceite de oliva, al cual se está prestando especial atención por sus propiedades nutricionales. Al aceite de oliva virgen, principal fuente de grasas en la Dieta Mediterránea, se le atribuyen diversos efectos beneficiosos que lo convierten en la opción de preferencia frente a las grasas de origen animal, e incluso otros aceites vegetales. De entre los efectos potencialmente beneficiosos para la salud, cabe destacar el relacionado con las enfermedades cardiovasculares: existe evidencia de que el consumo habitual de aceite de oliva reduce la mortalidad por enfermedades cardiovasculares [10]. Esto se explica por los efectos beneficiosos que éste ejerce en relación a los factores de riesgo cardiovascular, pues se conoce que la Dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva mejora el perfil lipídico y reduce la presión sanguínea, la resistencia a la insulina y los marcadores de inflamación sistémica [11,12].

Las propiedades beneficiosas del aceite de oliva se han atribuido a su elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), en relación con otras grasas; así como a otros componentes minoritarios como el escualeno y, principalmente, a los compuestos fenólicos [13]. Estos últimos ejercen funciones diversas en el organismo que se resumen en la Figura 1.

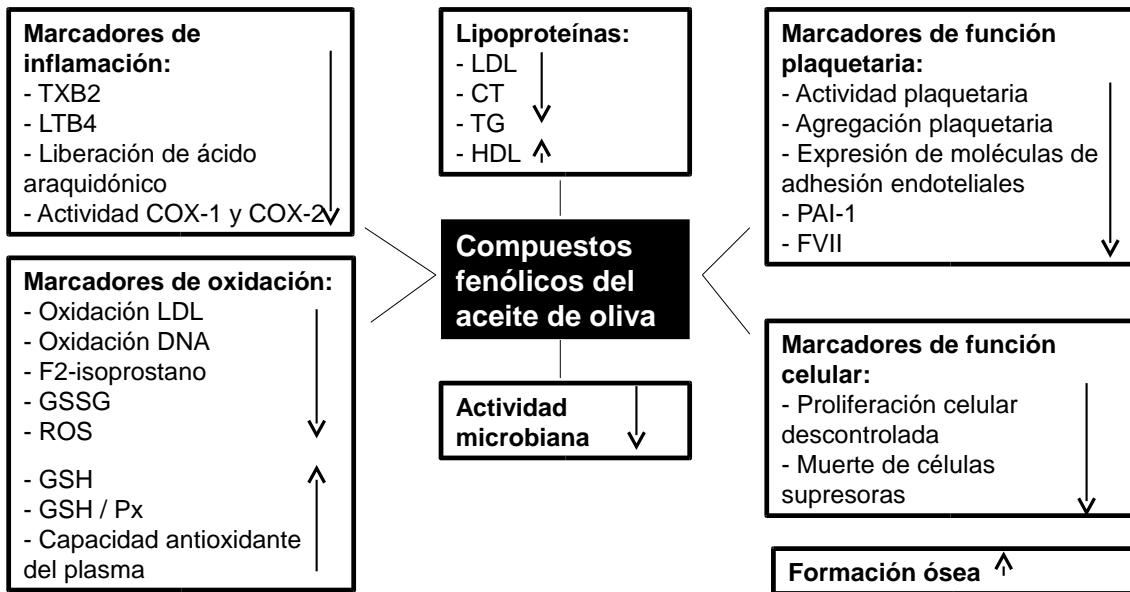


Figura 1. Funciones biológicas de los compuestos fenólicos del aceite de oliva (adaptada de Cicerale *et al.* [13]).

2.3 Importancia fisiológica de los antioxidantes liposolubles: vitamina E, vitamina A y carotenoides

Nuestro organismo dispone de un sistema antioxidante endógeno formado, por un lado, por un conjunto de enzimas como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa. Por otro lado, el organismo dispone de un sistema antioxidante no enzimático en forma de vitaminas como la vitamina A, la vitamina E y los carotenoides, que se modulan mediante la dieta y que cooperan y actúan sinérgicamente con la finalidad de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, como por ejemplo las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [14].

De hecho, en diversos estudios observacionales llevados a cabo en los últimos años se relacionan los antioxidantes liposolubles como la vitamina E, vitamina A y carotenoides con una reducción en la incidencia de enfermedades cardiovasculares [15].

La vitamina E es el antioxidante liposoluble más efectivo presente en nuestras células [16]. Existen ocho isómeros de esta molécula: cuatro

tocoferoles y cuatro tocotrienoles, todos ellos teniendo en su estructura un anillo aromático denominado *cromanol* unido a una cadena lateral saturada denominada *fitol*. Concretamente, el α -tocoferol es la forma con mayor actividad biológica. Su actividad antioxidante se relaciona con la capacidad de captar radicales peroxil que inician las reacciones de peroxidación de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas celulares. Esta capacidad viene determinada por la cadena central de cromanol. En presencia de peroxilos ($\text{ROO}\cdot$), el grupo cromanol del α -tocoferol (TOH) se le une formando un hidroperóxido y a la vez un radical tocoferoxil ($\text{TO}\cdot$). Posteriormente, el ácido ascórbico puede reducir el radical tocoferoxil a su estado natural.

De esta manera, la vitamina E se relaciona con un efecto protector en la modificación oxidativa de las partículas LDL [16]. Aparte de esta función antioxidante, también se le atribuye la capacidad de reducir o limitar la progresión de la aterosclerosis por otras vías como la inactivación de la proteína quinasa C (PKC), un marcador biológico de inflamación [16].

La vitamina A, por otra parte, se encuentra en el organismo en dos formas químicas diferentes. La primera es el *retinol*, un alcohol lipídico que se encuentra únicamente en alimentos de origen animal. Este puede ser metabolizado directamente a compuestos que ejercerán los efectos atribuidos a la vitamina A. La segunda forma es el *β -caroteno* o provitamina A, el cual se encuentra únicamente en plantas y puede convertirse en retinol durante la absorción intestinal. Ninguna de estas dos formas es biológicamente activa: el retinol requiere de una activación en una serie de reacciones oxidativas, y la provitamina A debe escindir-se para producir retinol [17]. Existen numerosos metabolitos de la vitamina A, siendo los que tienen unas funciones biológicas cruciales el *retinal* y el *ácido retinoico* [17].

La vitamina A ayuda a que los huesos y dientes se desarrollen y también mejora la visión, ya que interviene en el ciclo visual. Como antioxidante, protege las membranas celulares y el tejido adiposo, ayuda a reparar el daño causado por contaminantes presentes en el aire y también mejora el sistema

inmunológico. Este papel antioxidante de los metabolitos de esta vitamina se debe a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura.

Los carotenoides se dividen en dos tipos: las xantofilas (β -criptoxantina, zeaxantina, luteína), que contienen oxígeno en su estructura, y los carotenos (α -caroteno, β -caroteno), que no tienen oxígeno y por ello tienen un carácter más hidrofóbico que las anteriores [18].

Alrededor de 50 carotenoides, entre los cuales están el α -caroteno, el β -caroteno y la β -criptoxantina, pueden ser convertidos por nuestro organismo en vitamina A y, por tanto, se les atribuyen las funciones antioxidantes de esta vitamina [19]. Además, determinados carotenoides se relacionan con efectos beneficiosos concretos. En este sentido se ha demostrado que el licopeno protege contra el cáncer de próstata, que la luteína previene o incluso detiene la degeneración macular, y que el β -caroteno incrementa el sistema de defensa pulmonar [19].

2.4 Importancia de las LDL y HDL en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares

Existe evidencia de que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas son el componente necesario para que se inicie y/o progrese la aterogénesis a nivel molecular y celular. Las LDL son partículas ricas en colesterol pero, además, contienen alrededor de 1300 moléculas de ácidos grasos insaturados altamente sensibles a la oxidación [16].

La aterosclerosis, que es la principal causa de enfermedades cardiovasculares, se relaciona con un cúmulo de LDL oxidadas en la pared arterial. Las LDL oxidadas atraviesan el endotelio de las arterias junto con monocitos para adherirse posteriormente a la túnica íntima, donde estos últimos son convertidos en macrófagos y se forman así las células espumosas. Estas, junto con la inflamación existente en la íntima y el colágeno, forman lo que se conoce como placa de ateroma, provocando isquemia o bien, mediante su ruptura, la obstrucción de otras arterias.

Como las LDL, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportan colesterol pero, en este caso, su función es la de llevar el colesterol desde los tejidos al hígado para que este pueda ser excretado [20]. Mientras los niveles plasmáticos de LDL son relacionados directamente con la cardiopatía isquémica, los niveles de HDL se asocian inversamente a esta. Esto es así debido a su capacidad de retirar el colesterol de las arterias y transportarlo al hígado para su excreción. Sin embargo, esta relación de LDL y HDL con las enfermedades cardiovasculares puede ser modulada por factores capaces de protegerlas de la oxidación y, por tanto, mejorar su funcionalidad. Entre estos factores, en este trabajo destacaremos el papel que juegan las vitaminas liposolubles endógenas que se encuentran tanto en plasma como incorporadas en las HDL, y que intervienen en la protección oxidativa de estas partículas [21].

3. Hipótesis

El aceite de oliva enriquecido en compuestos fenólicos constituye una buena estrategia como alimento funcional tras demostrarse las propiedades antioxidantes de estos compuestos y su capacidad de mejorar el perfil lipídico.

No obstante, los fenoles del aceite de oliva aportan un carácter amargo indeseado para los consumidores. Además, se ha observado que un único aporte a una dosis muy elevada de un tipo de antioxidante podría tener un efecto indeseado aumentando el estrés oxidativo. Es por esto que se planteó el diseño de dos aceites funcionales: un aceite de oliva enriquecido con sus propios fenoles y otro con la misma concentración de fenoles pero complementado con otra fuente fenólica, concretamente el tomillo.

Una posible diana de los compuestos fenólicos son las HDL o lipoproteínas de alta densidad. La principal función de las HDL es la del transporte reverso de colesterol. Sin embargo, esta función implica que las HDL intercambien con las otras lipoproteínas (LDL y VLDL) no solo colesterol sino también ácidos grasos oxidados, haciéndolas susceptibles de sufrir también oxidaciones y, por tanto, limitar su función beneficiosa.

Por ello resulta importante conocer el tipo de defensa antioxidante con la que cuentan estas lipoproteínas, protegiéndolas del ataque de los radicales libres. En este sentido, las HDL disponen de un sistema antioxidante endógeno compuesto por vitaminas liposolubles, entre ellas la vitamina E, la vitamina A y los carotenoides. Es en este punto en el que se plantea la hipótesis del trabajo de que los compuestos fenólicos podrían modular el sistema de defensa endógeno evitando la oxidación de estas vitaminas y, por tanto, fortaleciendo el sistema de defensa antioxidante de las HDL.

Hasta donde sabemos, no existen estudios que describan métodos de análisis para la identificación y cuantificación de compuestos antioxidantes lipofílicos en HDL. Con la hipótesis de partida expuesta, surge la necesidad de

desarrollar una técnica que permita identificar y cuantificar estos compuestos en HDL.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es que una vez absorbidos los compuestos fenólicos del aceite de oliva y del tomillo, estos fenoles podrían tener un efecto protector de los antioxidantes endógenos de tipo lipofílico de manera que podrían modular sus niveles en plasma y, más concretamente, en HDL y, de este modo, contribuir en su defensa antioxidante.

4. Objetivos de la investigación

El objetivo general de esta investigación es el de evaluar cómo afecta el consumo de diferentes aceites de oliva enriquecidos en compuestos fenólicos en la modulación de los antioxidantes endógenos lipofílicos en plasma y en HDL, y sus posibles implicaciones sobre la salud.

Los objetivos específicos de esta investigación son:

- Desarrollar un método analítico de cromatografía líquida para determinar la composición de los antioxidantes lipofílicos endógenos en plasma y, posteriormente, en HDL.
- Determinar el efecto de la ingesta de un aceite de oliva enriquecido con sus propios fenoles (FOO1) y de otro aceite complementado con los fenoles del tomillo (FOO2) sobre la concentración de los antioxidantes lipofílicos del plasma y de las HDL.
- Contribuir al desarrollo de prototipos de aceites de oliva nutracéuticos que podrían ser recomendados para los individuos con alto riesgo cardiovascular.

5. Materiales y métodos

5.1 Diseño del estudio

Se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado y cruzado, en el que se obtuvieron muestras de plasma y HDL de 19 individuos (diez hombres y nueve mujeres) que durante tres períodos de tres semanas habían seguido una dieta suplementada con 25 mL/día de aceite crudo de tres tipos:

- Aceite de oliva virgen (VOO): aceite con bajo contenido en compuestos fenólicos (80 ppm), utilizado como aceite control.
- Aceite de oliva funcional 1 (FOO1): aceite de oliva virgen (VOO) enriquecido con sus propios compuestos fenólicos a través de un procedimiento desarrollado en el Departamento de Tecnología de los Alimentos, Universidad de Lleida. La concentración de compuestos fenólicos total es de 500 ppm. De esta manera, se trata de un aceite de oliva funcional enriquecido con sus fenoles naturales.
- Aceite de oliva funcional 2 (FOO2): aceite de oliva virgen (VOO) enriquecido con 250 ppm de sus propios compuestos fenólicos y 250 ppm de compuestos fenólicos del tomillo a través de un procedimiento desarrollado en el Departamento de Tecnología de los Alimentos, Universidad de Lleida. La concentración final de compuestos fenólicos es de 500 ppm.

Los 19 individuos fueron reclutados a partir de los Centros de Atención Primaria (CAP) de Barcelona e informados sobre los objetivos del estudio, obteniendo así su consentimiento firmado. La gestión del estudio se llevó a cabo en el IMIM-Hospital del Mar de Barcelona.

El criterio de inclusión era padecer hipercolesterolemia (>200 mg/dL colesterol total). Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Cambio del tratamiento farmacológico en los últimos 3 meses.

- Deportistas con elevada actividad física (gasto energético superior a 3000 kcal/semana en actividad física).
- Obesidad (IMC>35 kg/m²).
- Diabetes.
- Ser fumador.
- Alergias múltiples.
- Celiacía u otras enfermedades intestinales.
- Vegetarianismo.

Antes de comenzar el ensayo y de administrar cada aceite se llevó a cabo un periodo de *wash-out* o de blanqueo, en el que los individuos tuvieron que restringir la ingesta de aceite de oliva virgen y sólo se les permitía ingerir aceite de oliva refinado debido a su nulo contenido en fenoles. Además, se informó a los participantes de que tenían que evitar un elevado consumo de alimentos ricos en antioxidantes (verduras, frutas, legumbres, café, té, chocolate, vino y cerveza).

El aceite fue suministrado de forma dosificada en botellas de 25 mL, una para cada día (21 botellas para cada uno de los tres períodos de intervención). Al finalizar el período de consumo de aceite de oliva, los participantes tenían que devolver los contenedores de aceite para así poder registrar el grado de cumplimiento. El diseño del estudio se muestra a continuación (Fig. 2), donde se distribuyen los individuos en tres grupos de intervención de forma aleatorizada.

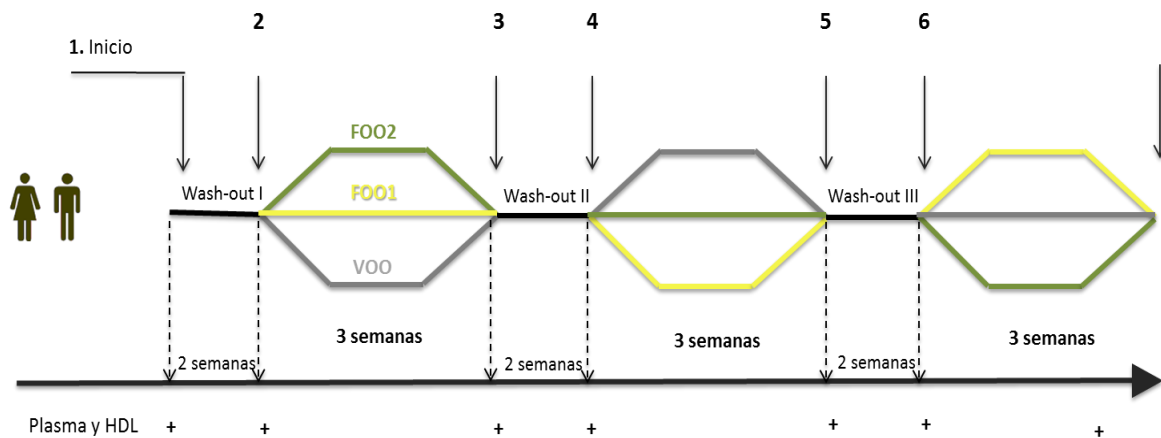


Figura 2. Diseño del estudio. Se trata de un estudio cruzado, de forma que los 19 individuos se dividieron en tres grupos de forma aleatorizada y siguieron tres órdenes de ingesta de los tres aceites.

De cada individuo se recogieron siete muestras de sangre: una al inicio del estudio (1), una después de un período de blanqueo de dos semanas (2), una después de la primera intervención (VOO, FOO1 o FOO2) (3), una después de un segundo blanqueo (4), una después de la segunda intervención (VOO, FOO1 o FOO2) (5), una después de un tercer blanqueo (6) y otra después de la tercera intervención (VOO, FOO1 o FOO2) (7).

A partir de las muestras de sangre se obtuvo el plasma y posteriormente, a partir de una alícuota, se aislaron las HDL. Las muestras fueron alícuotadas y fueron almacenadas en congelación a -80°C hasta el momento de su análisis. A partir de las muestras de plasma y HDL se determinaron los siguientes antioxidantes liposolubles: retinol, α -tocoferol y carotenoides (luteína y β -criptoxantina). Se analizaron las muestras correspondientes a las visitas 2-7 con el objetivo de confirmar si la ingesta continuada (21 días, 25 mL/día) de los aceites enriquecidos podía tener algún efecto en la concentración de los antioxidantes endógenos liposolubles mayoritarios y de más relevancia fisiológica.

5.2 Equipos, material y reactivos

Equipos utilizados:

- Agitador vórtex.
- Centrífuga HETTICH Universal 320-R.
- HPLC. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Waters).
- Evaporador con nitrógeno.

Material:

- Micropipeta 100 μ L y 1000 μ L.
- Eppendorf.
- Matraz aforado 10mL.
- Viales de cromatografía.

Disoluciones y reactivos:

- Patrón interno α -tocoferol acetato (Sigma).
- α -tocoferol (Sigma).
- Retinol (Sigma).
- β -criptoxantina y luteína (patrones aislados proporcionados por el Instituto de la Grasa. CSIC).
- n-hexano.
- Metanol.
- Etanol.
- Metil tert-butil éter.

5.3 Procedimiento

5.3.1 Extracción de los compuestos lipofílicos

Las muestras de plasma y HDL recogidas fueron almacenadas a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis.

El método utilizado para la extracción de las vitaminas liposolubles del plasma y HDL se basa en el método descrito por Reboul *et al.* [22] con algunas variaciones. El método de extracción adaptado se muestra de forma esquemática en la Figura 3.

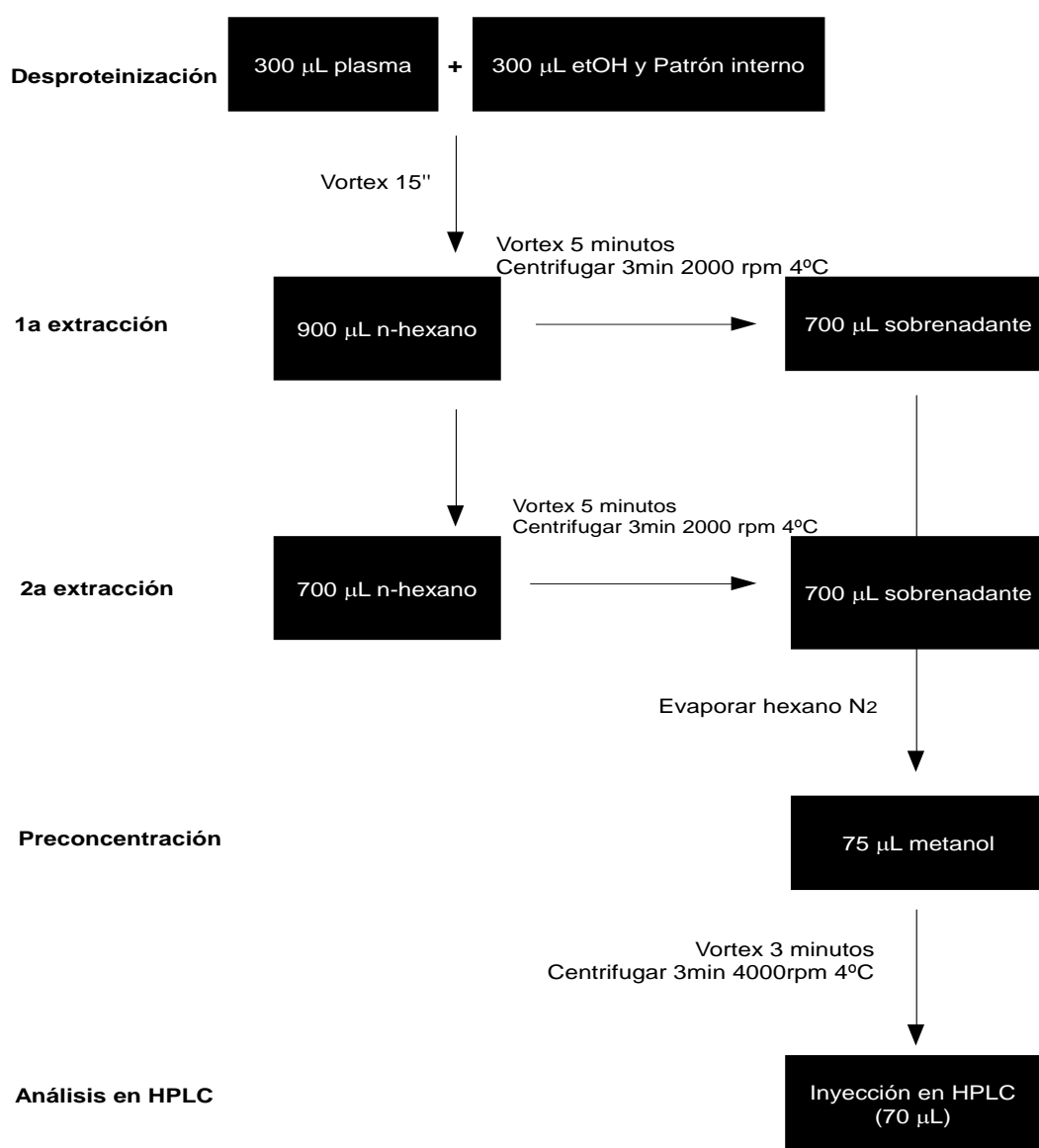


Figura 3. Procedimiento seguido para la extracción de vitaminas liposolubles en plasma.

Para la extracción de los compuestos lipofílicos en plasma se procedió de la siguiente manera: se pipetearon en un Eppendorf protegido de la luz ambiental 300 μ L de plasma y 300 μ L de etanol con patrón interno (α -tocoferol acetato, 100 ppm) y se mezcló durante 15 segundos con el agitador de tipo vórtex para favorecer así la desproteización de la muestra.

Posteriormente se añadieron 900 μ L de n-hexano (solvente apolar afín a los compuestos lipofílicos), se mezclaron mediante el agitador de tipo vórtex durante cinco minutos y se centrifugó durante tres minutos a 2000 rpm y 4 °C.

Al finalizar la centrifugación, se colocó el Eppendorf en hielo para favorecer la separación de fases. Se pipetearon 700 μ L de sobrenadante en otro Eppendorf y se mantuvieron en hielo mientras se realizaba una segunda extracción. En esta, se añadieron 700 μ L de n-hexano a la primera mezcla, se mezclaron mediante el agitador de tipo vórtex durante cinco minutos y, de nuevo, se centrifugó a 2000 rpm y 4 °C durante tres minutos. 700 μ L del sobrenadante resultante de esta segunda centrifugación se recogieron y se llevaron al Eppendorf en el que se había abocado el sobrenadante resultante de la primera centrifugación. El sobrenadante obtenido de las dos extracciones se evaporó bajo una corriente de Nitrógeno.

El residuo resultante fue reconstituido mediante la adición de 75 μ L de metanol, mezclando durante tres minutos mediante vórtex. Para asegurar que en la muestra no había partículas en suspensión, se llevó a cabo una centrifugación durante tres minutos a 4000 rpm y 4 °C. En último lugar, 70 μ L de esta mezcla fueron recogidos y trasladados a viales de HPLC para, finalmente, ser inyectados en HPLC.

Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras plasmáticas de las siete visitas de cada uno de los individuos.

Para la extracción de los compuestos lipofílicos en HDL se llevó a cabo el mismo procedimiento que en las muestras de plasma pero con algunas variaciones. En la primera etapa de desproteización, 400 μ L de HDL y 400 μ L de etanol más patrón interno fueron pipeteados en un Eppendorf. Para la

primera extracción se añadieron 800 μL de n-hexano y se extrajeron 600 μL de sobrenadante. Para la segunda extracción, se añadieron 600 μL de n-hexano y se recogieron 600 μL del sobrenadante. El resto de pasos no difieren de los seguidos en el caso del plasma.

5.3.2 Análisis cromatográfico

Una vez obtenido el extracto metanólico se prosiguió a realizar el análisis cromatográfico. Para éste, se siguió el método descrito por Gleize *et al.* [23] con ciertas variaciones. En este caso se usó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) formado por un equipo de bombas Waters 600E, un autosampler con un loop de inyección de 20 μL , un detector multi lambda de fluorescencia (Waters 2475) y un detector PDA (Waters 2996). La columna usada fue una YMC C30 (3 μm) de 4.6x150mm. El gradiente de solventes utilizado se especifica en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas en HPLC para el análisis de los compuestos.

Tiempo (min)	% Fase A (Metanol)	% Fase B (Metil tert-butil éter)	% Fase C (Agua)
0	96	2	2
27	18	80	2
31	96	2	2
35	96	2	2

A diferencia del método original, en el caso del α -tocoferol la detección se hizo con el detector de fluorescencia, ya que el pico cromatográfico aparecía con más señal y mejor resuelto. En cuanto al resto de compuestos analizados, la lectura se hizo mediante PDA a una longitud de onda de 325 nm en el caso del retinol y de 455 nm en el caso de los carotenoides. Los cromatogramas de los patrones usados para la preparación de las rectas patrón se muestran en la Figura 4, y las respectivas rectas de calibración en la Figura 5.

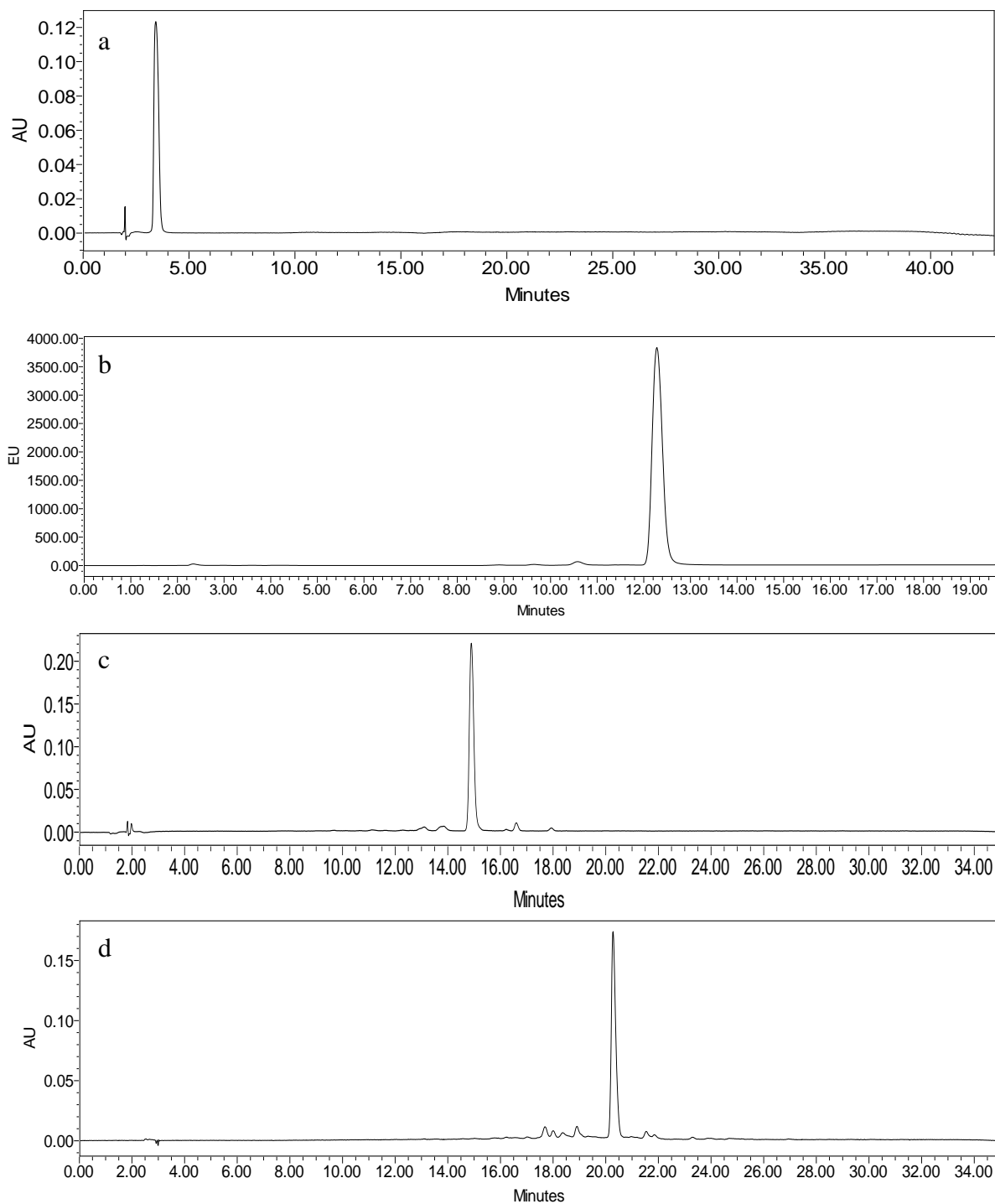


Figura 4. Cromatogramas de los patrones de los compuestos lipofílicos: (a) retinol detectado mediante PDA a una longitud de onda de 325 nm; (b) α -tocoferol detectado mediante fluorescencia; (c) luteína detectada con PDA a 455 nm y (d) β -criptoxantina detectada con PDA a 455 nm. El tiempo de retención para cada uno de ellos fue de: (a) $t_r=3.48$ min; (b) $t_r=12.2$ min, (c) $t_r=15.0$ min y (d) $t_r=20.4$ min.

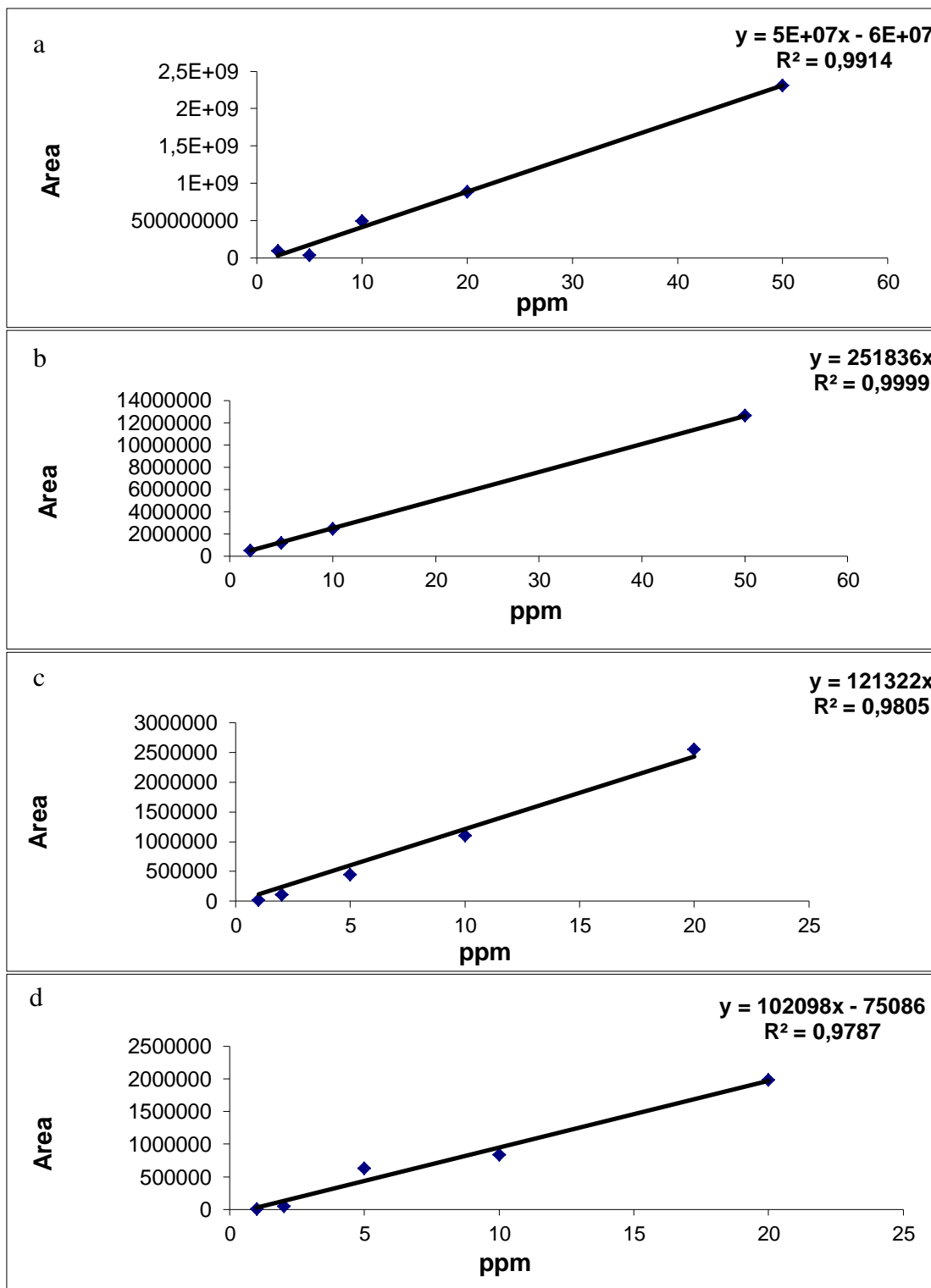


Figura 5. Rectas patrón de los compuestos lipofílicos: (a) retinol, (b) α -tocoferol, (c) luteína y (d) β -criptoxantina.

A partir de las rectas patrón se obtuvieron los valores de las concentraciones en mg/L o ppm y, posteriormente, se hicieron los cálculos pertinentes para expresar los resultados en $\mu\text{mol/L}$.

5.3.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se procedió a realizar un análisis de varianza de tipo ANOVA para comparar los valores de concentración de los compuestos antes y después del tratamiento con los aceites.

También se compararon los porcentajes de incremento o disminución de concentración de los compuestos en plasma y HDL el día 0 y el día 21 después cada intervención.

El programa estadístico utilizado para llevar a cabo este análisis fue Statgraphics Plus 5.0.

6. Resultados

6.1. Grado de cumplimiento

Con objeto de conocer el cumplimiento de la ingesta de aceites a lo largo del estudio por parte de los participantes, se les pidió que devolvieran todas las botellas de aceite (21 botellas/intervención) al finalizar cada una de las tres intervenciones.

De esta manera, se registró cuántas botellas había dejado cada individuo llenas, con un tercio de aceite o con el fondo de la botella de aceite. Posteriormente se establecieron unos grados de cumplimiento del uno al cuatro según los criterios que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios utilizados para establecer el grado de cumplimiento de la ingesta de aceites.

Grado	Volumen remanente en la botella	Número de botellas
4 o Muy alto	Llena	0
	Un tercio lleno	5 o <
	Fondo	15 o <
3 o Alto	Llena	0
	Un tercio lleno	5 o <
	Fondo	> 15
2 o Medio	Llena	1 - 5
1 o Bajo	Llena	> 5

Se prosiguió con la clasificación de los 19 individuos según su grado de cumplimiento de la ingesta de aceites (Tabla 3). El mayor grado de cumplimiento se dio en el caso del aceite control VOO. En el caso de los aceites FOO1 y FOO2, el grado de cumplimiento fue menor, probablemente debido al carácter amargo de estos. No obstante, el grado de cumplimiento se consideró aceptable para los tres aceites.

Tabla 3. Grado de cumplimiento de la ingesta de los tres aceites por parte de cada participante y la media de éste.

Individuo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Media
Grado	VOO	4	4	4	2	2	4	4	2	3	2	2	4	3	4	3	2	2	2	3	2,9
	FOO1	3	4	2	1	2	3	2	2	3	2	2	2	3	2	3	3	4	2	3	2,5
	FOO2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	4	2	2	2	2	3	2,3

6.2. Efecto de la ingesta de los aceites enriquecidos en los niveles de antioxidantes endógenos lipofílicos en plasma

Tras observar un cumplimiento satisfactorio de la ingesta de los aceites, se procedió con el análisis de las muestras de plasma para determinar si la ingesta de los aceites podría modular los niveles de vitaminas liposolubles en plasma.

Los compuestos lipofílicos que se pretendían encontrar en las muestras plasmáticas fueron detectados a unos tiempos de retención ligeramente diferentes a aquellos obtenidos con los patrones de los compuestos. Esto fue así porque los compuestos quedaron más retenidos en esta matriz y, por tanto, su tiempo de retención fue ligeramente más corto.

La Figura 6 muestra los cromatogramas de una muestra de plasma con los diferentes compuestos detectados a diferentes longitudes de onda en PDA y con fluorescencia. Como se observa, los compuestos lipofílicos más relevantes que se detectaron fueron el α -tocoferol, el retinol, la luteína y la β -criptoxantina. A 455 nm se detectaron más picos, probablemente otros carotenoides, pero no se tuvieron en cuenta ya que presentaron mucha variabilidad entre las muestras, siendo prácticamente indetectables en muchas de ellas debido, probablemente, a la alta inestabilidad de algunos de ellos como por ejemplo el β -caroteno.

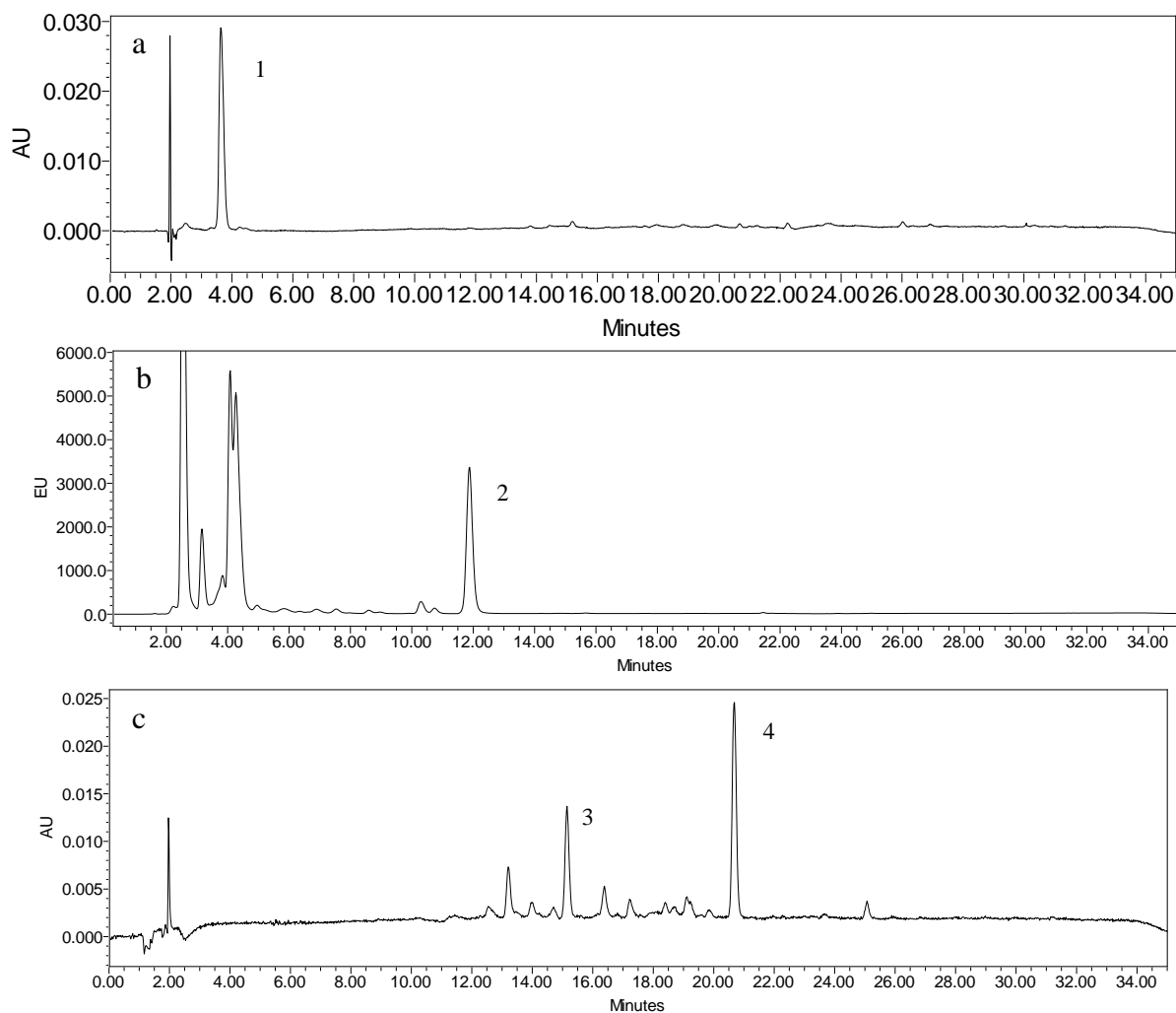


Figura 6. Cromatogramas de una muestra de plasma. (a) Cromatograma de retinol (1), detectado a $t_r=3.64$ min mediante PDA a una longitud de onda de 325 nm. (b) Cromatograma de α -tocoferol (2), detectado a $t_r=11.9$ min mediante fluorescencia. (c) Cromatograma de los carotenoides: luteína (3), detectada a $t_r=15.32$ min mediante PDA a 455 nm; β -criptoxantina (4), detectada a $t_r=20.84$ min mediante PDA a 455nm.

El compuesto que se detectó en mayor concentración en plasma fue el retinol, seguido por el α -tocoferol (Tabla 4). En relación a la variación de concentración pre y post tratamiento, se observa que la concentración plasmática de los compuestos analizados tiende a aumentar tras la ingesta de los aceites de oliva funcionales (FOO1 y FOO2) a diferencia del aceite control (VOO), donde se mantiene o sufre una ligera disminución. No obstante, cabe destacar que solo en el caso del retinol y del α -tocoferol estas diferencias fueron significativas ($p<0.05$) en los dos aceites funcionales.

Tabla 4. Promedio y desviación estándar (n=19) de la concentración plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de los compuestos analizados antes y después de la ingesta de cada aceite. (*) indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre la concentración del compuesto antes (pre) y después de cada intervención (post).

Compuesto	VOO		FOO1		FOO2	
	pre	post	pre	post	pre	post
Retinol	21,6 \pm 3,5	19,3 \pm 3,4	19,2 \pm 3,7	23,1 \pm 4,1 *	19,6 \pm 4,2	24,4 \pm 4,8 *
α -tocoferol	17,7 \pm 1,4	17,3 \pm 1,3	17,1 \pm 1,3	18,7 \pm 1,8 *	17,0 \pm 2,2	19,8 \pm 1,2 *
Luteína	6,3 \pm 3,3	5,5 \pm 2,5	5,1 \pm 1,9	6,3 \pm 2,1	5,8 \pm 4,6	8,1 \pm 4,6
β -criptoxantina	11,2 \pm 4,9	11,0 \pm 5,0	10,8 \pm 5,4	12,7 \pm 6,0	10,4 \pm 5,1	13,3 \pm 6,0

Si se representan los resultados en forma de porcentaje de incremento o disminución de la concentración de los compuestos respecto al control (día 0) de cada aceite y se comparan los valores de los aceites funcionales con los del aceite control VOO, se observa que en todos los casos existen diferencias significativas respecto al aceite control (Tabla 5, Fig. 7). Cabe destacar también que el aceite FOO2 presentó valores de incremento mayores que el aceite FOO1.

Tabla 5. Porcentaje de incremento o disminución y desviación estándar de la concentración plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de los compuestos analizados tras cada intervención. (*) indica que hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al aceite control VOO ($p<0.05$).

Compuesto	VOO	FOO1	FOO2
Retinol	- 9,6 \pm 17,1	21,5 \pm 15,2 *	28,4 \pm 11,3 *
α -tocoferol	- 2,0 \pm 3,7	10,2 \pm 8,3 *	18,8 \pm 13,8 *
Luteína	- 5,20 \pm 29,7	29,6 \pm 31,1 *	64,9 \pm 64,5 *
β -criptoxantina	- 1,4 \pm 9,4	19,1 \pm 14,0 *	32,5 \pm 29,9 *

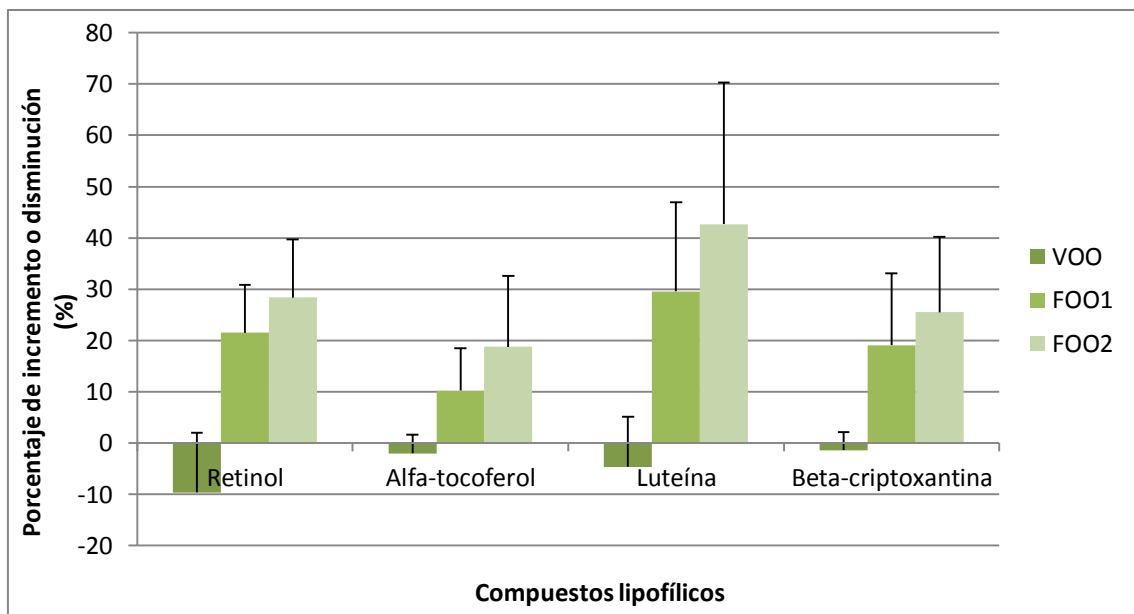


Figura 7. Representación gráfica del porcentaje de incremento o disminución y la desviación estándar de cada compuesto tras el período de tratamiento con cada aceite.

En las figuras que siguen se muestran gráficamente las variaciones de cada uno de los compuestos en plasma de los 19 individuos para cada uno de los aceites.

La concentración de retinol en plasma tras la ingesta del aceite control VOO presenta una gran variabilidad, disminuyendo en unos individuos e incrementando en otros (Fig. 8). No obstante, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de retinol después del período de tratamiento con respecto a la concentración del mismo antes de éste.

En el caso de los aceites funcionales FOO1 y FOO2 también se observa una gran variabilidad interindividual (Fig. 8), pero en los dos casos se observa un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la concentración de retinol.

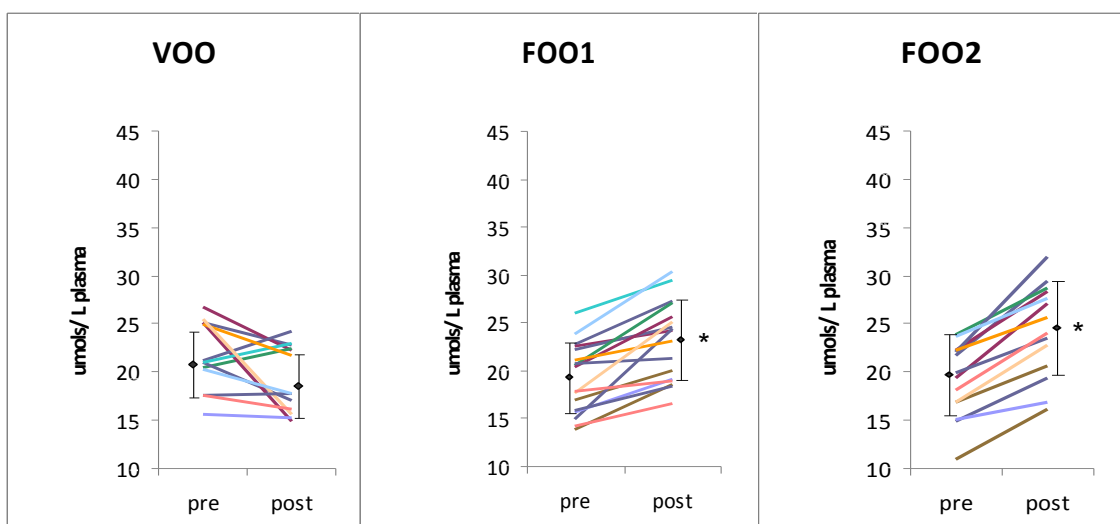


Figura 8. Concentración de retinol ($\mu\text{mol/L}$) en plasma antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2. (*) indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración del compuesto antes y después de la intervención de cada aceite ($p < 0.05$).

Tal y como ocurría con el retinol, la concentración de α -tocoferol en plasma se ve aumentada de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) después del tratamiento con los aceites funcionales FOO1 y FOO2 (Fig. 9).

En el caso del aceite control VOO, no hay diferencias estadísticamente significativas entre la concentración del compuesto antes y después del tratamiento (Fig.9).

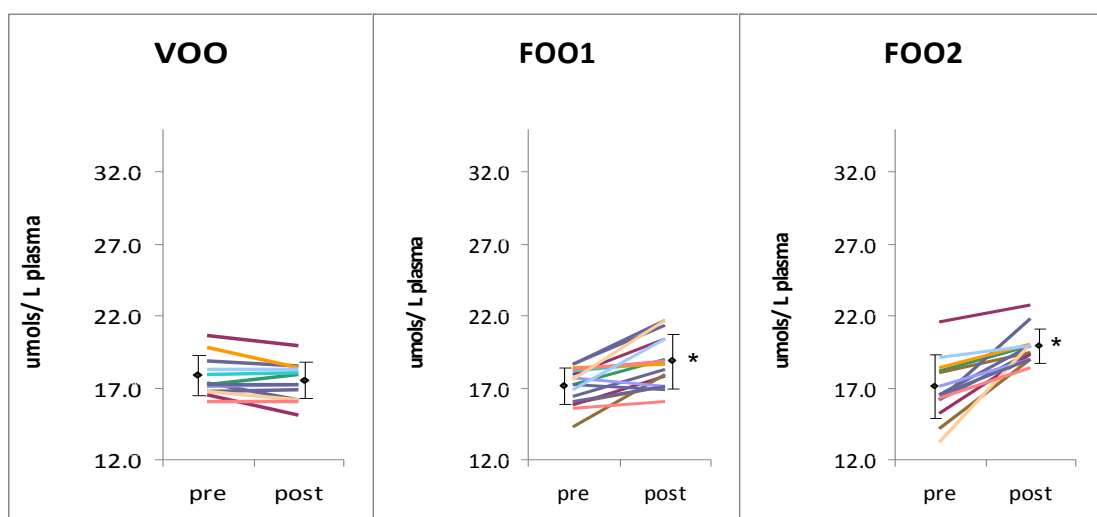


Figura 9. Concentración de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) en plasma antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2. (*) indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración del compuesto antes y después de la intervención de cada aceite ($p < 0.05$).

La concentración plasmática de luteína parece tener una tendencia al aumento tras la ingesta de los aceites de oliva funcionales FOO1 y FOO2 (Fig. 10). Sin embargo, no se puede decir que existan diferencias estadísticamente significativas en la concentración del compuesto entre el pre-tratamiento y post-tratamiento.

En el aceite control VOO, no se observa una tendencia al aumento sino que se produce una ligera disminución sin diferencias significativas (Fig. 10).

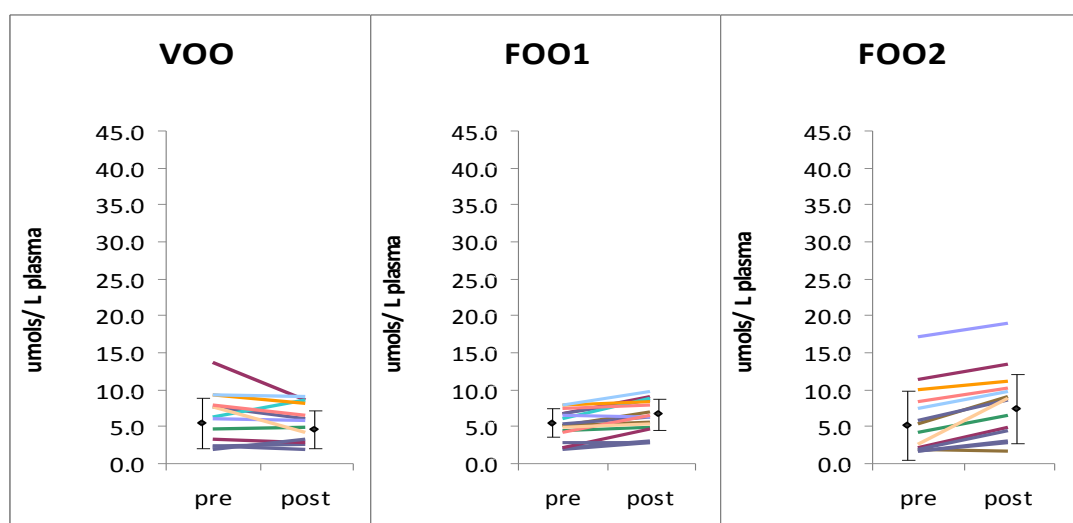


Figura 10. Concentración de luteína ($\mu\text{mol/L}$) en plasma antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2.

La concentración de β -criptoxantina en plasma también parece tener una tendencia a aumentar tras ingerir los aceites de oliva funcionales FOO1 y FOO2 (Fig. 11). No obstante, no existen diferencias estadísticamente significativas entre su concentración antes y después de la intervención.

En cuanto al aceite control VOO, aparentemente no se ve incrementada la concentración del compuesto después de la ingesta de este aceite (Fig. 11).

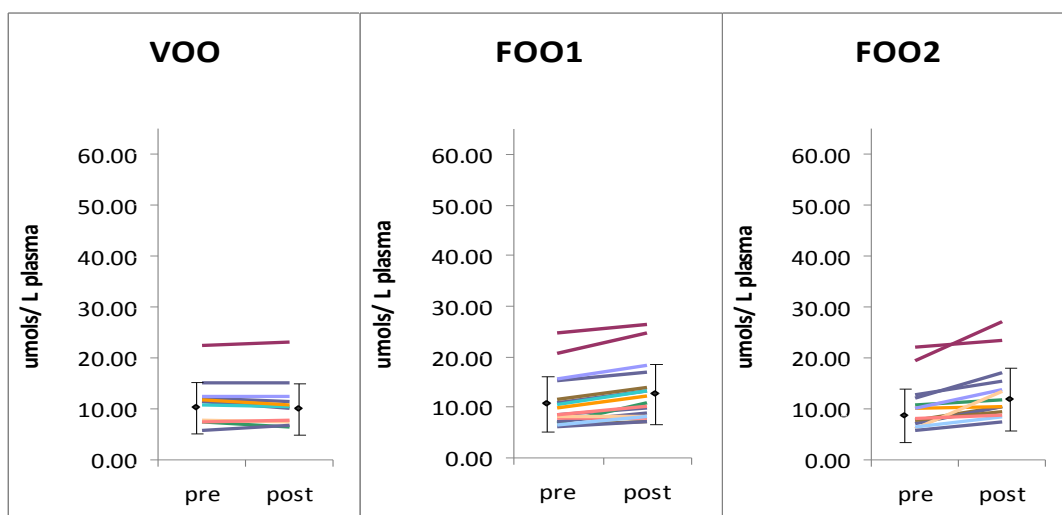


Figura 11. Concentración de β -criptoxantina ($\mu\text{mol/L}$) en plasma antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2.

6.3. Efecto de la ingesta de aceites enriquecidos en los niveles de antioxidantes endógenos lipofílicos en HDL

Una vez visto que en plasma los aceites enriquecidos son capaces de modular los niveles de antioxidantes lipofílicos endógenos, se procedió a analizar las HDL aisladas para estudiar si este efecto de potenciación del sistema antioxidante por parte de los aceites enriquecidos se producía en las HDL y, por tanto, podrían tener un efecto indirecto beneficioso en la protección contra las oxidaciones de los ácidos grasos de estas partículas.

Los compuestos que se detectaron mediante cromatografía en HDL fueron los mismos que en plasma pero en unas concentraciones más bajas (Fig. 12).

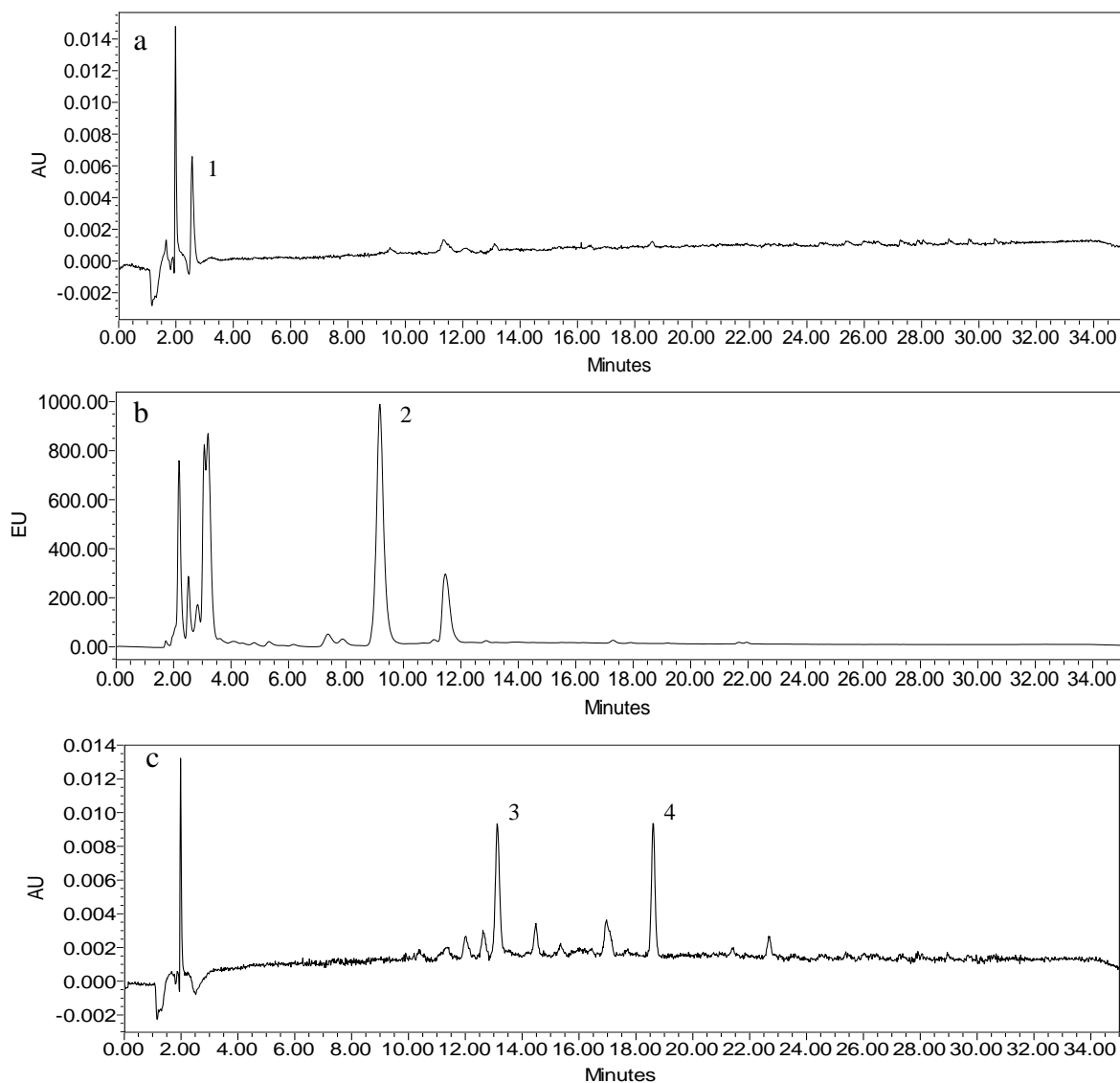


Figura 12. Cromatogramas de una muestra de HDL. (a) Cromatograma de retinol (1), detectado a $t_r=2.57$ min mediante PDA a una longitud de onda de 325 nm. (b) Cromatograma de α -tocoferol (2), detectado a $t_r=9.35$ min mediante fluorescencia. (c) Cromatograma de los carotenoides: luteína (3), detectada a $t_r=13.13$ min mediante PDA a 455 nm; β -criptoxantina (4), detectada a $t_r=18.61$ min mediante PDA a 455 nm.

La concentración en HDL de los compuestos analizados tiende a aumentar tras la ingesta de los aceites de oliva funcionales y se mantiene estable en el caso del aceite VOO (Tabla 6). El compuesto que se encuentra en mayor cantidad en las HDL es el α -tocoferol y es seguido por la β -criptoxantina.

Sin embargo, en ninguno de los casos existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6. Promedio y desviación estándar de la concentración en HDL ($\mu\text{mol/L}$) de los compuestos analizados antes y después de la ingesta de cada aceite.

Compuesto	VOO		FOO1		FOO2	
	pre	post	pre	post	pre	post
Retinol	$3,4 \pm 1,7$	$3,3 \pm 1,7$	$3,1 \pm 1,7$	$3,7 \pm 2,3$	$3,1 \pm 1,9$	$3,5 \pm 1,8$
α -tocoferol	$12,7 \pm 0,8$	$12,7 \pm 0,8$	$12,6 \pm 0,8$	$12,9 \pm 0,9$	$12,5 \pm 0,7$	$12,9 \pm 0,9$
Luteína	$2,2 \pm 1,0$	$2,2 \pm 1,0$	$1,8 \pm 1,2$	$2,4 \pm 1,1$	$2,4 \pm 1,2$	$2,7 \pm 1,4$
β -criptoxantina	$7,2 \pm 2,4$	$7,5 \pm 2,8$	$7,5 \pm 3,2$	$8,1 \pm 3,5$	$7,0 \pm 1,8$	$7,6 \pm 2,4$

Si se representan los resultados en forma de porcentaje de incremento o disminución de la concentración de los compuestos respecto al control (día 0) de cada aceite y se comparan los valores de los aceites funcionales con los del aceite control VOO, se observa que en prácticamente todos los casos existen diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al aceite control (Tabla 7, Fig. 13). En el caso del aceite control VOO, las concentraciones se mantienen iguales o se ven disminuidas tras el periodo de tratamiento excepto en el caso de la β -criptoxantina, en la que existe un ligero aumento del 2.2%.

Tabla 7. Porcentaje de incremento o disminución y desviación estándar de la concentración en HDL ($\mu\text{mol/L}$) de los compuestos lipofílicos analizados tras cada intervención. (*) indica que existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al aceite control VOO ($p < 0,05$).

Compuesto	VOO	FOO1	FOO2
Retinol	$-1,8 \pm 14$	$21,0 \pm 34,0$ (*)	$24,9 \pm 39,8$ (*)
α -tocoferol	$-0,4 \pm 3,6$	$2,7 \pm 3,3$ (*)	$3,4 \pm 4,3$ (*)
Luteína	$-0,2 \pm 25,4$	$44,3 \pm 55,5$ (*)	$17,8 \pm 29,0$
β -criptoxantina	$2,2 \pm 7,3$	$8,7 \pm 7,9$ (*)	$6,8 \pm 8,6$

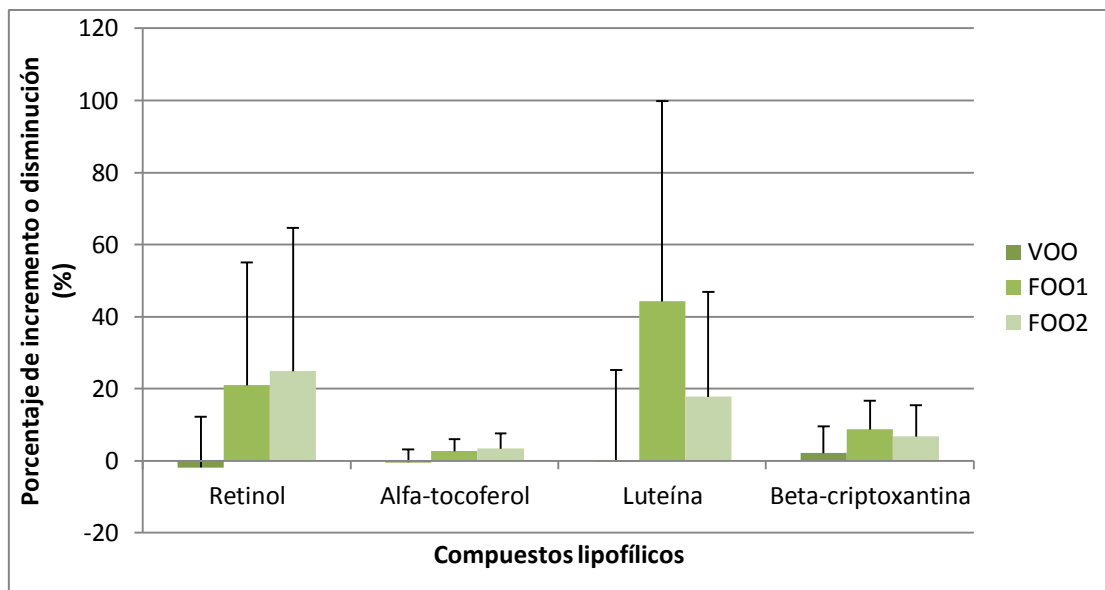


Figura 13. Representación gráfica del porcentaje de incremento o disminución en HDL de cada compuesto tras el período de tratamiento con cada aceite.

En las figuras que siguen (Fig. 14, 15, 16, 17) se muestran gráficamente las variaciones de cada uno de los compuestos en HDL de los 19 individuos tras la intervención con cada uno de los aceites.

A diferencia de lo que ocurría en el caso de las muestras plasmáticas, en estas cuatro figuras se observa que existe una gran variedad en el efecto que la ingesta de los aceites funcionales FOO1 y FOO2 tiene sobre la concentración de antioxidantes lipofílicos en las partículas HDL. En algunos individuos esta concentración se ve incrementada y en otros se ve disminuida, a pesar de que se observa una tendencia general al aumento. No obstante, en ninguno de los compuestos se observan diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de vitaminas liposolubles presente en HDL después con respecto a antes del tratamiento.

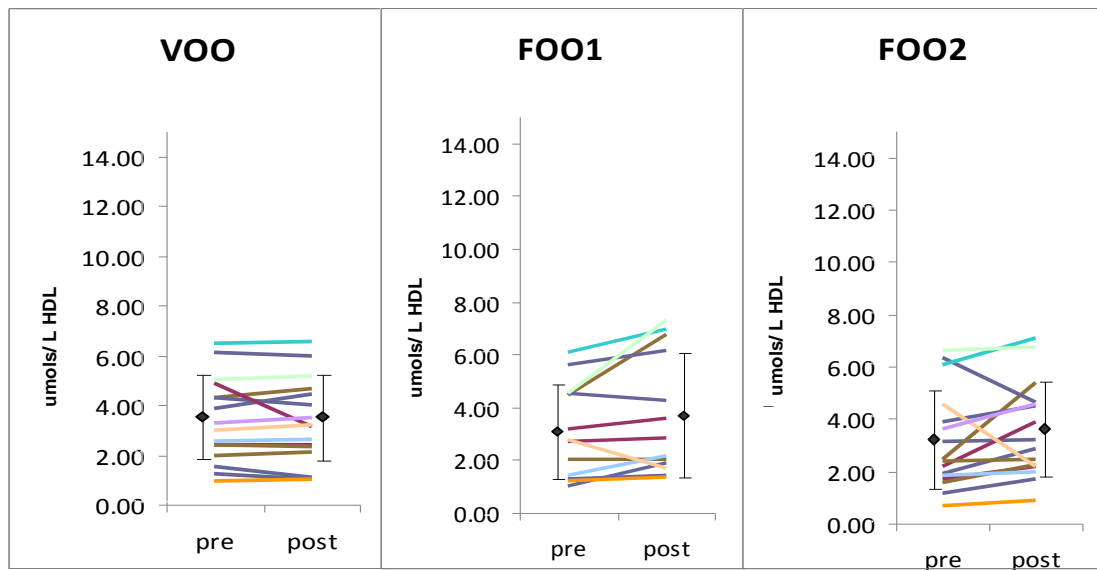


Figura 14. Concentración de retinol ($\mu\text{mol/L}$) en HDL antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2.

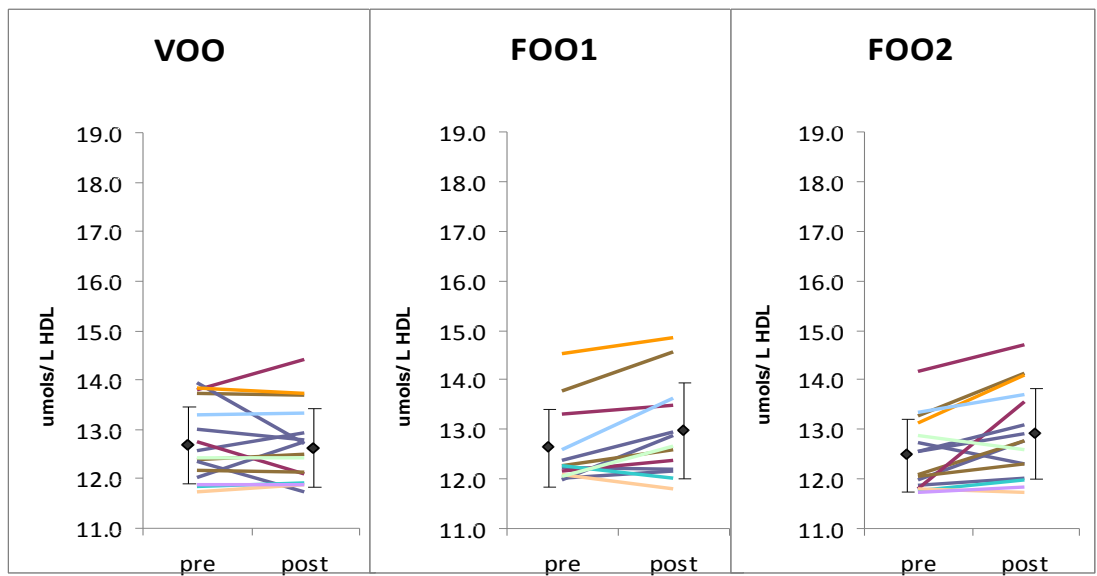


Figura 15. Concentración de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) en HDL antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2.

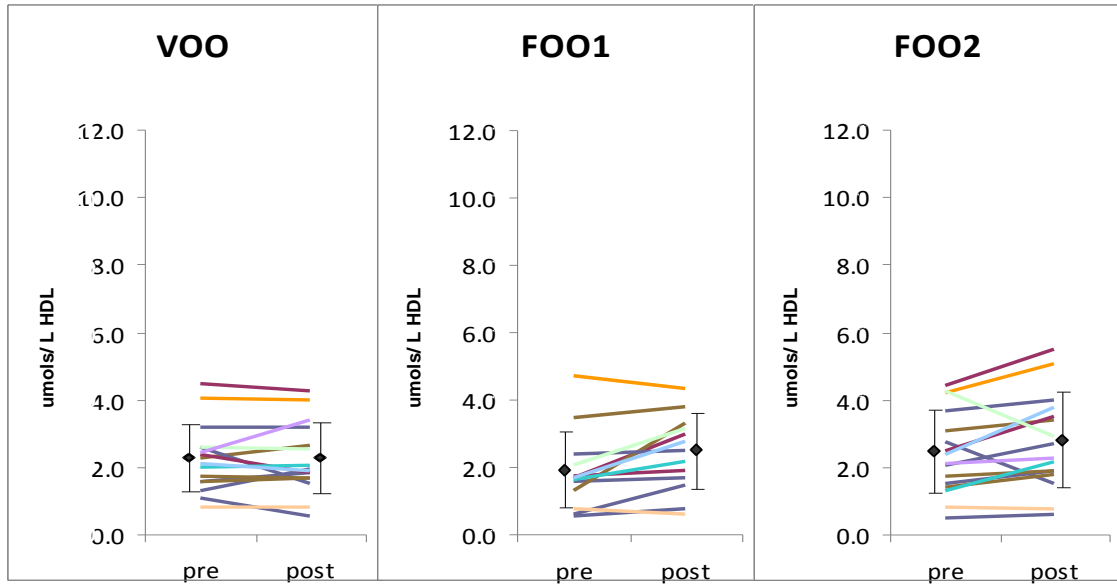


Figura 16. Concentración de luteína ($\mu\text{mol/L}$) en HDL antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2.

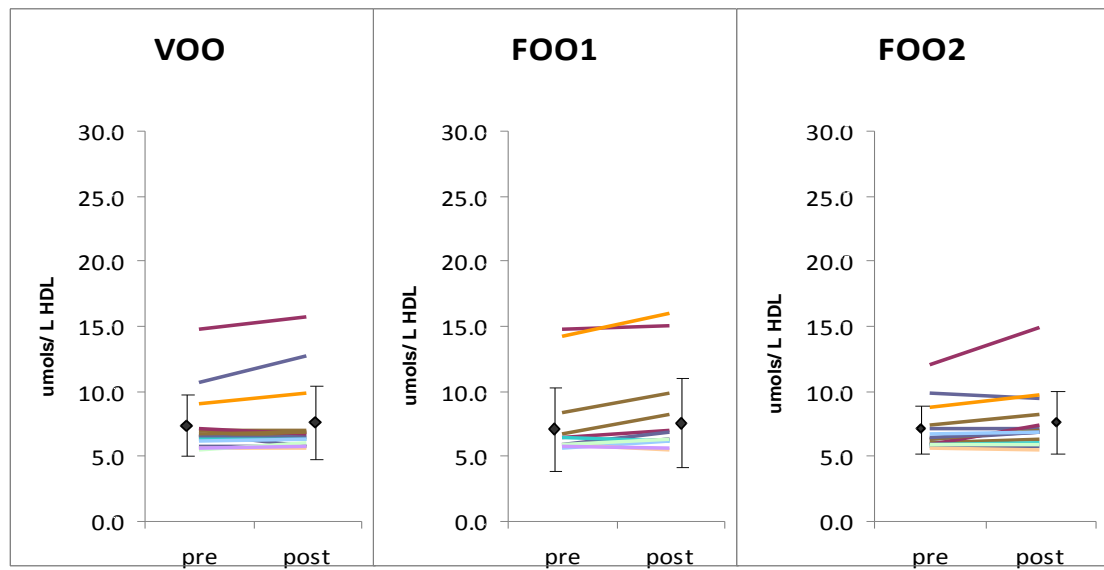


Figura 17. Concentración de β -criptoxantina ($\mu\text{mol/L}$) en HDL antes y después de ingerir los aceites VOO, FOO1 y FOO2.

7. Discusión

El presente trabajo se enmarca en un proyecto coordinado cuyo objetivo es el de desarrollar aceites de oliva funcionales enriquecidos con polifenoles y evaluar su bioactividad en relación a la funcionalidad de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

En este contexto se llevó a cabo un estudio de intervención de ingesta prolongada con dos aceites funcionales y un aceite control, en el cual se tuvieron en cuenta diversos parámetros relacionados con la funcionalidad de las HDL: la proteína de transferencia de esteres de colesterol (CETP), la actividad de la organofosfatasa y la PON1, la fluidez de la membrana, el diámetro de las partículas, la resistencia a la oxidación de las HDL, la expresión de genes relacionados con la funcionalidad de las HDL, el contenido en fenoles y, finalmente, el contenido en compuestos antioxidantes lipofílicos, el objeto de estudio del presente trabajo.

Ante la hipótesis planteada de que un enriquecimiento del aceite de oliva con compuestos fenólicos podría modular el nivel de antioxidantes liposolubles en plasma y HDL y, por tanto, mejorar el estatus antioxidante endógeno, los resultados analizados en el presente trabajo mostraron que, efectivamente, una ingesta sostenida durante 21 días de aceites con alto contenido fenólico aumentó significativamente los niveles de antioxidantes endógenos con respecto a un aceite control de bajo contenido fenólico, tanto en plasma como en HDL.

En un estudio previo (proyecto EUROLIVE) en el que 200 individuos europeos siguieron una dieta suplementada con tres tipos de aceites de oliva similares pero con un contenido fenólico diferente, se mostró un incremento en los niveles de colesterol HDL y una disminución del daño oxidativo de las LDL dependientes de la dosis de compuestos fenólicos presente en los aceites administrados [24].

Este aumento de colesterol HDL en relación directa con el contenido fenólico del aceite de oliva también ha sido estudiado y demostrado en estudios experimentales en animales [25, 26].

Por tanto, hay evidencia suficiente de que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de aumentar la cantidad de partículas HDL.

Sin embargo, estudios de intervención recientes sugieren que además de los niveles de HDL circulantes, es importante fijar la atención en marcadores relacionados con la funcionalidad de las HDL tales como el eflujo de colesterol y el transporte reverso del colesterol, ya que se conoce que son marcadores claros de enfermedad cardiovascular [27]. En un estudio llevado a cabo por Girona *et al.*, se analizó la funcionalidad del colesterol HDL oxidado en términos del transporte reverso de colesterol libre desde las células y se concluyó que este se veía reducido en dichas circunstancias [28]. Otro estudio reciente [29] indicó el papel importante que tienen los polifenoles procedentes del aceite de oliva en la regulación de genes que intervienen en la mejora del eflujo de colesterol desde las células a las partículas HDL en humanos.

Tal y como se ha demostrado en el presente trabajo, partículas lipofílicas antioxidantes como el α -tocoferol, el retinol y los carotenoides con afinidad a las membranas se han detectado en concentraciones destacables en las HDL y, por tanto, podrían ejercer un papel muy importante en la protección oxidativa de estas partículas así como en su funcionalidad.

Los resultados de este trabajo demuestran que tanto una ingesta sostenida de fenoles del aceite de oliva como la mezcla de fenoles de oliva y tomillo son capaces de modular de forma significativa los niveles de antioxidantes lipofílicos endógenos en plasma y HDL en comparación con una ingesta de un aceite de oliva bajo en fenoles. Esto se podría explicar por un efecto protector ejercido por parte de los polifenoles sobre los compuestos lipofílicos evitando su oxidación. En consecuencia, esta modulación podría tener un efecto positivo en la mejora del eflujo del colesterol.

Estudios previos han analizado el efecto de la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes sobre el nivel de antioxidantes en plasma [30] viendo una modulación en algunos casos, pero por primera vez se ha visto un efecto más específico sobre las HDL.

Si se comparan los dos aceites funcionales, se observa que en plasma el aceite funcional FOO2 enriquecido con fenoles de oliva y tomillo produce un mayor aumento de todos los compuestos analizados que el aceite FOO1, solo enriquecido con fenoles de oliva. Estas diferencias observadas en plasma podrían ser debidas a cierto efecto sinérgico entre las dos fuentes fenólicas, tal y como se ha demostrado en estudios *in vitro* [31] e *in vivo* [32].

No obstante, se observa una gran variabilidad interindividual en los niveles de compuestos lipofílicos circulantes. Estas diferencias entre individuos son recurrentes en estudios de intervención en humanos y podrían vincularse a la influencia que ejercen otros factores diferentes a las cantidades ingeridas de dichos compuestos. En este sentido, uno de los factores que podrían intervenir sería el genético, tal y como se ha demostrado previamente con la vitamina E y los carotenoides circulantes [33, 34]. Para intentar reducir esta variabilidad sería necesario contar con un mayor número de participantes.

8. Conclusión

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que, por primera vez, se ha observado un efecto modulador de los niveles de antioxidantes lipofílicos endógenos en plasma y en HDL, concretamente de α -tocoferol, retinol, luteína y β -criptoxantina, por parte de los polifenoles tanto de la oliva como de la mezcla oliva-tomillo. Este aumento observado tras la ingesta prolongada de aceites enriquecidos con fenoles podría ser debido a un efecto protector de los mismos evitando la oxidación de los compuestos antioxidantes, lo cual sería relevante para la mejora de la funcionalidad de las HDL debido a que podría mejorar la protección oxidativa de las lipoproteínas y, de esta manera, mejorar su funcionalidad. Por tanto, estos resultados tendrán que ser observados en el conjunto de los otros parámetros relacionados con la funcionalidad de las HDL para poder confirmar que los aceites funcionales mejoran la funcionalidad de estas lipoproteínas.

Con los resultados obtenidos y a la espera de otros resultados complementarios, si se demuestra que pueden modular otros parámetros, los aceites de oliva funcionales utilizados en el presente estudio podrían ser una buena opción para la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares. No obstante, es necesario tener en cuenta que la gran variabilidad interindividual podría hacer que no en todos los individuos ejercieran un efecto significativo.

9. Bibliografía

1. Cardiovascular diseases (CVDs). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2007. Fact sheet no. 317. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>). Consultado el 5 de marzo de 2013.
2. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, et al. Mediterranean diet pyramid: A cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 1995 Jun 1995;61(6):1402S.
3. Fidanza F, Alberti A, Lanti M, Menotti A. Mediterranean Adequacy Index: correlation with 25-year mortality from coronary heart disease in the Seven Countries Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004;14(5):254e8.
4. Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 2004;292(12):1433e9.
5. Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation* 2009;119(8):1093e100.
6. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348(26):2599e608.
7. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Leda Matalas A, Chrysohoou C, Stefanadis C. Geographical influences on the association between adherence to the Mediterranean diet and the prevalence of acute coronary syndromes, in Greece: The CARDIO2000 study. *Int J Cardiol* 2005 4/8;100(1):135-142.
8. Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Marti A, Martinez JA, Martin-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of

a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* 2002;41(4):153e60.

9. Tuttle KR, Shuler LA, Packard DP, Milton JE, Daratha KB, Bibus DM, et al. Comparison of low-fat versus Mediterranean style dietary intervention after first myocardial infarction (from The Heart Institute of Spokane Diet Intervention and Evaluation Trial). *Am J Cardiol* 2008;101(11):1523e30.

10. Buckland G, Mayén AL, Agudo A, Travier N, Navarro C, Huerta JM, et al. Olive oil intake and mortality within the Spanish population (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr* 2012;96(1):142-149.

11. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006 Jul 4;145(1):1-11

12. Harwood JL, Yaqoob P. Nutritional and health aspects of olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* 2002;104(9-10):685-697.

13. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Int J Mol Sci*. 2010;11(2):458–479.

14. Honarbakhsh S, Schachter M. Vitamins and cardiovascular disease. *Br J Nutr* 2009;101(8):1113-31.

15. Willcox B, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease: Key Lessons from Epidemiologic Studies. *Am J Cardiol* 2008; 101[suppl]:75D– 86D.

16. Morrissey PA, Kiely M. Vitamin E. Physiology and Health Effects. *Encyclopedia of Human Nutrition* 2005;389-398.

17. Ross AC. Vitamin A: Physiology. *Encyclopedia of Human Nutrition* 2005;329-339.

18. Ishida BK, Bartley GE. Carotenoids: Chemistry, Sources and Physiology. *Encyclopedia of Human Nutrition* 2005;330-339.

19. Tanumihardjo SA, Yang Z. Carotenoids: Epidemiology of Health Effects. *Encyclopedia of Human Nutrition* 2005;339.
20. Nadeem N, Woodside JV, Kelly S, Allister R, Young IS, McEneny J. The two faces of α - and γ -tocopherols: an in vitro and ex vivo investigation into VLDL, LDL and HDL oxidation. *J Nutr Biochem* 2012 7;23(7):845-851.
21. Wade L, Nadeem N, Young IS, Woodside JV, McGinty A, McMaster C, et al. α -Tocopherol induces proatherogenic changes to HDL2 & HDL3: An in vitro and ex vivo investigation. *Atherosclerosis* 2013 2;226(2):392-397.
22. Reboul E, Thap S, Tourniaire F, André M, Juhel C, Morange S, et al. Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *Br J Nutr* 2007;97(3):440-446.
23. Gleize B, Steib M, Andre M, Reboul E. Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples. *Food Chemistry* 2012;134(4):2560-2564.
24. Covas MI, Nyssönen K, Poulsen HE, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. *Ann Int Med* 2006;145:333-341.
25. Mangas-Cruz MA, Fernández-Moyano A, Albi T, Guinda A, Relimpio F, Lanzón A, et al. Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clinical Nutrition* 2001 6;20(3):211-215.
26. Farag RS, El-Baroty GS, Basuny AM. Safety evaluation of olive phenolic compounds as natural antioxidants. *Int J Food Sci Nutr* 2003;54(3):159-174.
27. Triolo M, Annema W, Dullaart RPF, Tietge UJF. Assessing the functional properties of high-density lipoproteins: An emerging concept in cardiovascular research. *Biomarkers in Medicine* 2013;7(3):457-472.
28. Girona J, LaVille AE, Solà R, Motta C, Masana L. HDL derived from the different phases of conjugated diene formation reduces membrane fluidity and contributes to a decrease in free cholesterol efflux from human THP-1

macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2003 9/22;1633(3):143-148.

29. Farràs M, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Giralt M, Solà R, Subirana I, et al. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial. *J Nutr Biochem* 2013.

30. Basu A, Betts NM, Mulugeta A, Tong C, Newman E, Lyons TJ. Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. *Nutr Res* 2013;33(3):180-187.

31. Herrmann F, Wink M. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. *Phytomedicine* 2011;18(13):1191-1196.

32. Kennedy DO, Scholey AB, Wesnes KA. Differential, dose dependent changes in cognitive performance following acute administration of a Ginkgo biloba/Panax ginseng combination to healthy young volunteers. *Nutritional Neuroscience* 2001;4(5):399-412

33. Borel P, Moussa M, Reboul E, Lyan B, Defoort C, Vincent-Baudry S, et al. Human fasting plasma concentrations of vitamin E and carotenoids, and their association with genetic variants in apo C-III, cholesteryl ester transfer protein, hepatic lipase, intestinal fatty acid binding protein and microsomal triacylglycerol transfer protein. *Br J Nutr* 2009;101(5):680-687.

34. Borel P, Moussa M, Reboul E, Lyan B, Defoort C, Vincent-Baudry S, et al. Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *J Nutr* 2007;137(12):2653-2659.

