



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

*Facultat de Farmàcia*

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació,  
Toxicologia i Medicina Legal

**BIOACCESIBILIDAD Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE ESTEROLES  
VEGETALES Y SUS ÓXIDOS EN UNA BEBIDA LÁCTEA  
ENRIQUECIDA EN ESTEROLES VEGETALES**

**BIOACCESSIBILITY AND BIOLOGICAL EFFECTS OF PLANT  
STEROLS AND THEIR OXIDES IN A PLANT STEROL-ENRICHED  
MILK BEVERAGE**

**BIOACCESSIBILITAT I EFECTES BIOLÒGICS D'ESTEROLS  
VEGETALS I ELS SEUS ÒXIDS EN UNA BEGUDA LÀCTIA  
ENRIQUIDA EN ESTEROLS VEGETALS**

*DOCTORAT EN CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ*

*TESI DOCTORAL INTERNACIONAL*

Presentada per:

**Laia Alemany Costa**

Dirigida per:

**Dr. J. Moisès Laparra Llopis**

**Dra. Amparo Alegría Torán**

**Dra. Reyes Barberá Sáez**

Burjassot, 11 de març 2013



Las Dras. Amparo Asunción Alegría Torán y Reyes Barberá Sáez, profesora titular y catedrática, respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal, de la Universitat de València y el Dr. José Moisés Laparra Llopis, investigador de Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

### CERTIFICAN QUE:

La licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Laia Alemany Costa ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título **“Bioaccesibilidad y efectos biológicos de esteroides vegetales y sus óxidos en una bebida láctea enriquecida en esteroides vegetales”**. El trabajo ha dado lugar a 4 artículos:

1. *Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. Food Research International, 48 (2012) 265-270. Índice de impacto: 3,150.*

2. *Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. Food and Chemical Toxicology, 50 (2012) 3106–3113. Índice de impacto: 2,999.*

3. *Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. Food Research International, 52 (2013) 1-7. Índice de impacto: 3,150.*

4. *Relative expression of cholesterol transport-related proteins and inflammation markers through the induction of 7-ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells. Food and Chemical Toxicology, 56 (2013) 247-253. Índice de impacto: 2,999.*

Por ello, autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que conste a los efectos oportunos,

En Burjassot, 11 de març de 2013

Fdo: J. Moisés Laparra

Fdo: Amparo Alegría

Fdo: Reyes Barberá



Las Dras. Amparo Asunción Alegría Torán y Reyes Barberá Sáez, profesora titular y catedrática, respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología en el Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal, de la Universitat de València y el Dr. José Moisés Laparra Llopis, investigador de Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

**INFORMAN QUE:**

La licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Laia Alemany Costa ha contribuido en el trabajo que lleva por título “*Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant*” a partes iguales con Dña. Marina González Larena.

En Burjassot, 11 de març de 2013

Fdo: J. Moisés Laparra

Fdo: Amparo Alegría

Fdo: Reyes Barberá



La presente tesis doctoral internacional se ha realizado en el grupo *Bionutest* (03/003) y se enmarca en el proyecto AGL2008-02591-C02-01: “Óxidos de fitoesteroles: formación, biodisponibilidad, citotoxicidad en bebidas a base de leche y zumo de frutas” financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

Ha sido parcialmente financiado por el proyecto Consolider-Ingenio 2010 CSD2007-00063 (Fun-C-Food).

La doctoranda Laia Alemany Costa, ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana (Resolució de 27 de març de 2009).

Esta tesis se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado Internacional: “*Chemistry, Toxicology and Healthiness of foods*” coordinado por el Prof. Pietro Damiani y la Prof.ssa Lina Cossignani. Università degli Studi di Perugia.







*Croyez ceux qui cherchent la vérité,  
doutez de ceux qui la trouvent*

*Toda verdad es simple...  
No es eso doblemente mentira?*



**ÍNDICE**  
***CONTENT***



---

	<b>Página</b>
<b>Índice de cuadros / Table index</b>	VII
<b>Índice de figuras / Figures index</b>	IX
<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>	XIII
<b>RESUMEN / SUMMARY</b>	1
<b>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO / OBJECTIVES AND WORK PLAN</b>	11
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS / LITERATURE REVIEW</b>	17
1. Esteroles vegetales	19
1.1 Estructura	19
1.2 Absorción y metabolismo	20
1.3 Funciones fisiológicas	24
1.4 Contenidos en alimentos e ingestas a partir de la dieta	35
1.5 Alimentos enriquecidos en esteroles vegetales	40
1.6 Biodisponibilidad (solubilidad, absorción, metabolismo)	49
1.6.1 Evaluación de la biodisponibilidad	51
1.6.2 Cultivos celulares	57
2. Óxidos de esteroles vegetales	59
2.1 Formación	59

	<b>Página</b>
2.2 Efectos biológicos	64
2.3 Contenidos de óxidos de esteroides vegetales en alimentos e ingredientes	76
2.4 Biodisponibilidad	84
<b>RESULTADOS / RESULTS</b>	<b>95</b>
Bloque I. Determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en esteroides vegetales	97
1. Optimización de la identificación de óxidos de esteroides vegetales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	99
2. Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources	105
3. Estabilidad de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas de zumo de frutas y leche	135
4. Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages	145
Bloque II. Efectos biológicos <i>in vitro</i> de los óxidos de esteroides	177
5. Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells	179

---

	<b>Página</b>
6. Relative expression of cholesterol transport-related proteins and inflammation markers through the induction of 7-ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells	209
7. Efectos citotóxicos de 7-cetosteroides en células del hepatoma humano (HepG2)	239
8. Obtención de óxidos de esteroides	245
<b>DISCUSIÓN GENERAL / GENERAL DISCUSSION</b>	<b>257</b>
1. Determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en esteroides vegetales	259
1.1 Selección de un ingrediente fuente de esteroides vegetales	259
1.2 Bioaccesibilidad de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche	263
2. Evaluación de los efectos biológicos inducidos por los 7-cetosteroides	267
2.1 Citotoxicidad	267
2.2 Potencial inflamatorio	270
2.3 Absorción y metabolismo	272
<b>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</b>	<b>277</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES</b>	<b>285</b>
<b>ANEXOS / ANNEXES</b>	<b>329</b>

	<b>Página</b>
I. Nombres comunes y sistemáticos de esteroides y sus óxidos	331
II. Metodología	333
III. Reactivos y disoluciones	369
<b>DIFUSIÓN DE RESULTADOS / RESULTS DIFFUSION</b>	<b>377</b>



**Índice de cuadros / Table index**

<b>Nº Cuadro</b>		<b>Nº Página</b>
1	Contenido de esteroles vegetales (mg/100g) en alimentos.	36-37
2	Contenidos individuales de esteroles vegetales (mg/100g) en alimentos.	38-39
3	Legislación relativa a los alimentos enriquecidos en esteroles vegetales permitidos en la Unión Europea.	44
4	Declaraciones permitidas de propiedades saludables.	45
5	Contenido individual y total de esteroles vegetales (g/100 g de ingrediente) en ingredientes fuente de esteroles vegetales.	48
6	Contenido de óxidos de esteroles vegetales en alimentos ( $\mu\text{g/g}$ lípidos).	77
7a	Contenido individual de óxidos de $\beta$ -sitosterol en alimentos ( $\mu\text{g/g}$ lípidos).	79
7b	Contenido individual de óxidos de campesterol en alimentos ( $\mu\text{g/g}$ lípidos).	80
8	Contenidos de óxidos de esteroles vegetales ( $\mu\text{g}/100$ g de ingrediente) en ingredientes utilizados en el enriquecimiento de esteroles vegetales en alimentos (González-Larena et al., 2011).	82
9	Óxidos obtenidos por termooxidación de $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol, identificados por GC-MS.	104
10	Información nutricional de las bebidas a base de zumo y leche enriquecidas en EV utilizadas en el estudio de	136

<b>Nº Cuadro</b>		<b>Nº Página</b>
	intervención clínica.	
11	Contenidos de esteroides vegetales (mg/100 g bebida) en las bebidas de zumo de frutas y leche (FbMa, FbMb).	138
12	Contenidos de óxidos de esteroides vegetales (mg/100 g esteroides vegetales) en FbMa.	141
13	Contenidos de óxidos de esteroides vegetales (mg/100 g esteroides vegetales) en FbMb.	142
14	Contenidos de esteroides vegetales en las mezclas patrón ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de estándar).	247
15	Óxidos de esteroides vegetales: Cuantificación y grado de pureza.	253
16	Cantidad de esteroides vegetales y sus óxidos determinados antes y después de la termooxidación (g/100 g de estándar).	255
17	Linealidad. Curvas de calibrado de los fitoesteroides y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ).	338
18	Factores de respuesta calculados a partir de 3 réplicas independientes.	343
19	Composición de los diferentes jugos empleados en la digestión gastrointestinal simulada (Granado et al., 2007).	346
20	Curvas de calibrado utilizadas en la cuantificación de los óxidos de esteroides vegetales en fracciones bioaccesibles y los iones monitorizados (SIM) en cada caso.	349

**Índice de figuras / Figure index**

<b>Nº Figura</b>		<b>Páginas</b>
1	Estructuras del colesterol y principales esteroides vegetales en alimentos.	20
2	Mecanismo de absorción de los esteroides (Ros, 2006).	21
3	Metabolismo de los esteroides circulantes (Palou et al., 2005).	23
4	Componentes de la micela mixta.	26
5	Definición de biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad (Fernández-García et al., 2009).	51
6	Productos de oxidación mayoritarios del $\beta$ -sitosterol (adaptación de Lea et al., 2004).	59
7	Mecanismo radicalario de oxidación del $\beta$ -sitosterol (adaptación de Soupas et al., 2004).	60
8	Esquema del diseño experimental.	91
9	Desarrollo del diseño experimental. Relación con la difusión de resultados.	93
10	Óxidos de esteroides vegetales identificados en las disoluciones termooxidadas de $\beta$ -sitosterol (a), campesterol (b) o estigmasterol (c).	101-102
11	Cromatograma (a), espectro en GC-MS (b) y GC-MS/MS (c) relativo a la identificación de 7-cetosterol. En rojo se indica el ion precursor y en azul los característicos.	103

<b>Nº Figura</b>		<b>Páginas</b>
12	Representación esquemática del estudio de intervención.	137
13	Potencial de membrana mitocondrial en células hepáticas (HepG2) tratadas con distintas concentraciones de 7-cetoesteroles.	241
14	Potencial de membrana mitocondrial en células hepáticas (HepG2) tratadas con los óxidos individuales o mezclas.	242
15	Cromatograma (a) y espectro (b) correspondientes al 7-cetoderivado.	249
16	Perfil cromatográfico de los óxidos obtenidos por termooxidación y separados por HPLC.	250
17	Expresión (ARNm) relativa del receptor de IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y factor de transcripción nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) en células Caco-2 expuestas a 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol.	272
18	Identificación de los esteroides vegetales por GC-FID.	337
19	Esquema de determinación de esteroides vegetales.	339
20	Factor de respuesta de los óxidos de colesterol.	342
21	Esquema de determinación de óxidos de esteroides.	344
22	Esquema general de determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en las fracciones bioaccesibles de bebidas a base de zumo y/o leche.	350

<b>Nº Figura</b>		<b>Páginas</b>
23	Extracción de ARN de los cultivos celulares Caco-2.	361
24	Determinación de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10) en sobrenadantes de cultivos celulares Caco-2.	364
25	Procedimiento experimental para evaluar la influencia de los 7-cetoesteroles en el metabolismo del colesterol y en la producción de citoquinas.	366



**ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS**

**$\Delta\Psi_m$** : potencial de membrana

**[Ca]<sub>i</sub>**: concentración de calcio intracelular

**ABCG5/8**: transportadores de excreción dependientes de ATP

**ACAT**: acilcoenzima A colesterol aciltransferasa

**ADN**: ácido desoxiribonucleico

**ADNc**: ácido desoxiribonucleico cíclico

**ARN**: ácido ribonucleico

**ARNm**: ácido ribonucleico mensajero

**BA**: bioaccesibilidad

**BD**: biodisponibilidad

**BHT**: butilhidroxitolueno

**BSA**: albúmina bovina sérica

**COPs**: productos de oxidación del colesterol

**CRP**: proteína C reactiva

**DE**: desviación estándar

**DHR**: 1,2,3-dihidrorodamina

**DMEM**: Dulbecco's Modified Eagle Medium

**EC**: energía de colisión

**EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético

**EV**: esteroides vegetales

**eV**: electronvoltios

**FADH<sub>2</sub>**: dinucleótido de flavina-adenina reducido

**FB**: fracción bioaccesible

**FR**: factor de respuesta

**GC-FID:** cromatografía de gases con detección de ionización de llama

**GC-MS:** cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**HMDS:** hexametildisilazano

**HMGC<sub>o</sub>A:** hidroximetilglutaril Coenzima A

**HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución

**Hx:** hexano

**IDL:** lipoproteínas de densidad intermedia

**IL:** interleuquina

**IFN $\gamma$ :** interferon  $\gamma$

**Ip:** isopropanol

**IP:** yoduro de propidio

**ITQ:** trampa iónica

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LDLox:** lipoproteínas LDL oxidadas

**LRP:** proteína relacionada con el receptor de las LDL

**LXR:** receptor hepático X

**MAPK:** proteínas quinasas mitógenas activadas

**MCP-1:** proteína quimioatrayente de monocitos 1

**MTP:** proteína microsomal transportadora de triglicéridos

**MTT:** bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil tetrazolio

**NADH:** nicotinamida adenín dinucleótido reducido

**NF $\kappa$ B:** factor nuclear kappa B

**NPC1L1:** Niemann-Pick C1-Like 1

**PBS:** disolución fosfato tamponada

**PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno-1



**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PI:** patrón interno

**POPs:** productos de oxidación de los esteroides vegetales

**QM:** quilomicrones

**rLDL:** receptor LDL

**SRA:** receptor de las LDL oxidadas

**SOPs:** productos de oxidación de esteroides

**SPE:** extracción en fase sólida

**SREBP:** proteína de unión de esteroides

**TG:** triglicéridos

**TMB:** tetrametilbenzidina

**TMCS:** trimetilclorosilano

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral

**tr:** tiempo de retención

**trr:** tiempo de retención relativo

**VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad



## **RESUMEN / SUMMARY / RESUM**

El colesterol ha sido asociado directamente como factor clave en las enfermedades de riesgo cardiovascular. El efecto de los esteroides vegetales (EV) en la reducción del colesterol (10-15%) es ampliamente conocido, si bien, la ingesta necesaria (2-3 g/día) para este efecto debe ser superior a la dietética. Por ello, los EV se utilizan en el enriquecimiento de alimentos, siendo la margarina el primer alimento enriquecido. Este tipo de alimentos es contrario a las recomendaciones dietéticas actuales orientadas hacia un menor consumo de grasa, por ello actualmente se han enriquecido otros alimentos con mejor perfil nutricional (leche, zumo con leche, yogur...).

Los EV pueden oxidarse dando lugar a productos de oxidación (POPs). Los estudios en los que se evalúan los efectos biológicos relativos a los POPs son escasos y, en muchos casos, contradictorios. Debido a la similitud estructural, se atribuyen los efectos causados por los productos de oxidación del colesterol (COPs) a los POPs, los cuales se han relacionado con una serie de patologías relacionadas con la modulación del metabolismo lipídico y la disfunción celular.

El objetivo de la presente tesis doctoral es el estudio de los EV y POPs en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en EV, mediante la selección de un ingrediente fuente de EV, el estudio de estabilidad de los EV y la bioaccesibilidad (BA) de los EV y POPs presentes en dichas bebidas utilizadas en el marco de un estudio de intervención clínica en humanos. Paralelamente se han evaluado los efectos biológicos de 7-cetoderivados de estigmasterol y colesterol en cultivos celulares del epitelio intestinal (Caco-2) como primera barrera

fisiológica para la absorción de estos compuestos. El estudio de los efectos biológicos incluye la determinación de la citotoxicidad causada por los 7-cetoesteroles (evaluando la actividad lisosomal, la funcionalidad e integridad mitocondrial y el contenido de ácidos nucleicos), el potencial inflamatorio (mediante la expresión relativa (ARNm) de biomarcadores (NFκB, TNFα, receptor IL-1β) la cuantificación de citoquinas (TNFα, IL-1β, IL-8, IL-10) y su efecto sobre la modulación del metabolismo del colesterol (monitorización de transportadores (NPC1L1, ABCG5/8) y enzimas (HMGCoA, ACAT)).

Se optimiza (energías de colisión) la identificación de POPs por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para la posterior detección de estos compuestos en las bebidas utilizadas en la presente tesis doctoral. De los dos ingredientes ensayados (*tall oil* y aceites vegetales), se selecciona el *tall oil*. Este ingrediente permite una mejor cuantificación (disminución de la formación de emulsiones y mejor reproducibilidad en ambas matrices (zumo y zumo con leche)) de los EV en las bebidas a las que se ha adicionado.

El almacenamiento (24°C, 4 meses) de las bebidas enriquecidas no produce cambios en el contenido de EV, si bien, existe un incremento significativo del contenido de POPs durante dicho almacenamiento. Los valores de BA indican diferencias en la solubilidad de los EV dependiendo de la longitud de la cadena alquílica, siendo el campesterol el más bioaccesible. En el caso de los POPs, la BA es superior que en el caso de los EV y, de entre ellos, el sitostanol es el más bioaccesible.

Los resultados relativos a los efectos biológicos causados por los 7-cetoesteroles en células Caco-2 señalan, principalmente, el compartimento

mitocondrial como principal diana de su citotoxicidad, siendo el efecto causado por el 7-cetocolesterol superior al del 7-cetoestigmasterol. La presencia conjunta de ambos 7-cetoderivados, indica una interacción negativa, mostrando una reducción del efecto tóxico del derivado del colesterol. No obstante, la expresión de biomarcadores (NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , receptor IL-1 $\beta$ ) y la cuantificación de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10) pone de manifiesto el mayor potencial inflamatorio del 7-cetoestigmasterol. La monitorización de la expresión relativa de transportadores (NPC1L1, ABCG5/8) y enzimas (HMGCoA, ACAT) relacionados con el metabolismo del colesterol, indican que el poder reductor y el ATP están directamente relacionados con el metabolismo de los 7-cetoesteroles, sin embargo, la influencia del calcio intracelular parece ser determinante en las células incubadas con 7-cetoestigmasterol.

El estudio preliminar sobre el potencial efecto citotóxico de los 7-cetoderivados sobre células HepG2 indica una mayor susceptibilidad de esta línea celular *versus* las células Caco-2, hecho de especial relevancia dado que el metabolismo de los compuestos lipídicos tiene lugar en el hígado.

En general, los efectos observados indican que pequeños cambios en la estructura química de los productos de oxidación de los esteroides condicionan el efecto fisiológico determinado *in vitro*.

Cholesterol has been associated with diseases related to cardiovascular risk. The cholesterol-lowering effect (10-15%) of plant sterols (PS) is widely known, but the intake required (2-3 g/day) to achieve this effect is higher than the dietetic intake. Plant sterols are therefore used in food enrichment – margarine being the first enriched food of this kind. However, foods of this type are contrary to current dietary recommendations which indicate a lower fat intake. As a result, other foods with a better nutritional profile have been enriched with PS (milk, juice with milk, yogurt, etc.).

Plant sterols can be oxidized, forming oxidation products (POPs). Studies on the biological effects of POPs are scarce and sometimes contradictory. Due to their structural similarity, the effects caused by cholesterol oxidation products (COPs) are attributed to POPs, which have been implicated in a number of pathologies related to the modulation of lipid metabolism and cellular dysfunction.

The objective of this thesis is the study of PS and POPs in fruit and/or milk-enriched beverages, by selecting an ingredient source of PS, investigating the stability of PS and the bioavailability (BA) of the PS and POPs present in these beverages and used as part of a clinical intervention study in humans. Moreover, the biological effects of 7-ketoderivatives of stigmasterol and cholesterol have been evaluated in intestinal epithelial cell cultures (Caco-2) as a first physiological barrier for the absorption of these compounds. The evaluation of biological effects included the determination of cytotoxicity caused by 7-ketosterols (evaluating lysosomal activity, mitochondrial function and integrity, and nucleic acids content), their inflammatory potential (via the relative expression (mRNA)

of biomarkers (NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  receptor) and the quantification of cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10)), and their effect upon the modulation of cholesterol metabolism (monitoring protein transporters (NPC1L1, ABCG5/8) and enzymes (HMGCoA, ACAT)).

The identification of POPs by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) has been optimized (collision energies) for the subsequent detection of these compounds in the beverages used in this thesis. After evaluating two ingredients for PS enrichment, tall oil has been chosen. This ingredient allows better PS quantification (decreasing formation of emulsions and increasing reproducibility in both matrixes (juice and juice with milk)) in the enriched beverages.

The storage (24°C, 4 months) of fortified beverages induces no changes in PS content, though there is a significant increase in POPs content. BA values indicate differences in the solubility of PS depending on the length of the alkyl chain - campesterol being the most bioavailable molecule. In the case of POPs, BA is higher than for PS - the most bioavailable molecule in this case being sitostanol.

The results of the biological effects caused by 7-ketosterols in Caco-2 cells show the main subcellular target to be the mitochondrial compartment - the effect caused by 7-ketocholesterol being greater than that of 7-ketostigmasterol. The combined presence of both 7-ketoderivatives indicates a negative interaction through reduction of the toxic effect induced by the cholesterol derivative. However, the biomarkers expression (NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , receptor IL-1 $\beta$ ) and the cytokines quantification (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10) attributes the greatest inflammatory potential to 7-ketostigmasterol. The relative expression of transporters

(NPC1L1, ABCG5/8) and enzymes (HMGCoA, ACAT) related to cholesterol homeostasis indicates that the reducing power and ATP are directly related to the metabolism of 7-ketosterols, but the influence of intracellular calcium appears to be determinant in cells incubated with 7-ketostigmasterol.

The preliminary study on the potential cytotoxic effect of 7-ketoderivatives upon HepG2 cells indicates a greater susceptibility of this cell line *versus* Caco-2 cells. This is of particular relevance, because lipid metabolism takes place in the liver.

In general, the observed effects indicate that small changes in the chemical structure of the sterol oxidation products condition the physiological effects observed *in vitro*.



S'ha associat directament el colesterol com a factor clau en les malalties de risc cardiovascular. L'efecte dels esterols vegetals (EV) en la reducció del colesterol (10-15%) és àmpliament conegut, no obstant això, la ingesta necessària (2-3g/dia) per a aquest efecte ha de ser superior a la dietètica. Per això, els EV s'utilitzen en l'enriquiment d'aliments, essent la margarina el primer aliment enriquit. Aquest tipus d'aliments és contrari a les recomendacions dietètiques actuals, orientades cap a un menor consum de grasa, per això actualment s'han enriquit altres aliments amb millor perfil nutricional (llet, suc amb llet, iogurt...).

Els EV poden oxidar-se donant lloc a productes d'oxidació (POPs). Els estudis en els quals s'avaluen els efectes biològics relatius als POPs son escassos i, en molts casos, contradictoris. A causa de la similitud estructural, s'atribueixen els efectes causats pels productes d'oxidació del colesterol (COPs) als POPs, els quals s'han relacionat amb una sèrie de patologies relacionades amb la modulació del metabolisme lipídic i la disfunció cel·lular.

L'objectiu de la present tesi doctoral és l'estudi dels EV i POPs en begudes a base de suc de fruites i/o llet enriquides en EV, mitjançant la selecció d'un ingredient font d'EV, l'estudi d'estabilitat dels EV i la bioaccessibilitat (BA) dels EV i POP presents en aquestes begudes utilitzades en el marc d'un estudi d'intervenció clínica en humans.

Paral·lelament s'han avaluat els efectes biològics de 7-cetoderivats de estigmasterol i colesterol en cultius cel·lulars de l'epiteli intestinal (Caco-2) com a primera barrera fisiològica per a l'absorció d'aquests compostos. La determinació dels efectes biològics inclou la determinació de la citotoxicitat causada pels 7-cetoesterols (avaluant l'activitat lisosomal, la

funcionalitat i integritat mitocondrial i el contingut d'àcids nucleics), el potencial inflamatori (mitjançant l'expressió relativa (ARNm) de biomarcadors (NFκB, TNFα, receptor IL-1β) y la quantificació de citocines (TNFα, IL -1β, IL-8, IL-10) i el seu efecte sobre la modulació del metabolisme del colesterol (monitorització de transportadors (NPC1L1, ABCG5/8) i enzims (HMGCoA, ACAT)).

S'optimitza (energies de col·lisió) la identificació de POPs per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS) per a la posterior detecció d'aquests compostos en les begudes utilitzades en aquesta tesi doctoral. Dels dos ingredients assajats (*tall oil* i olis vegetals) es selecciona el *tall oil*. Aquest ingredient permet una millor quantificació (disminució de la formació d'emulsions i millor reproductibilitat en ambdues matrius (suc i suc amb llet)) dels EV a les begudes a les quals s'ha addicionat.

L'emmagatzemament (24°C, 4 mesos) de les begudes enriquides no produeix canvis en el contingut de EV, no obstant això, s'observa un increment significatiu del contingut de POPs durant aquest emmagatzemament. Els valors de BA indiquen diferències en la solubilitat dels EV dependent de la longitud de la cadena alquílica, sent el campesterol el més bioaccessible. En el cas dels POP, la BA és superior que en el cas dels EV i, d'entre ells, el sitostanoltriol és el més bioaccessible.

Els resultats relatius als efectes biològics causats pels 7-cetoesterols en cèl·lules Caco-2 assenyalen, principalment, el compartiment mitocondrial com a principal diana de la seua citotoxicitat, sent l'efecte causat pel 7-cetocolesterol superior al del 7-cetoestigmasterol. La presència conjunta dels dos 7-cetoderivats, indica una interacció negativa,

mostrant una reducció de l'efecte tòxic del derivat del colesterol. Tanmateix, l'expressió de biomarcadors (NFκB, TNFα, receptor IL-1β) i la quantificació de citoquines (TNFα, IL-8, IL-10) posa de manifest el major potencial inflamatori del 7-cetoestigmasterol. El monitoratge de l'expressió relativa de transportadors (NPC1L1, ABCG5/8) i enzims (HMGCoA, ACAT) relacionats amb l'homeòstasi del colesterol, indiquen que el poder reductor i l'ATP estan directament relacionats amb el metabolisme dels 7-cetoesterols, no obstant això, la influència del calci intracel·lular sembla ser determinant en les cèl·lules incubades amb 7-cetoestigmasterol.

L'estudi preliminar sobre el potencial efecte citotòxic dels 7-cetoderivats sobre cèl·lules HepG2 indica una major susceptibilitat d'aquesta línia cel·lular *versus* les cèl·lules Caco-2, fet d'especial rellevància ja que el metabolisme dels compostos lipídics té lloc al fetge.

En general, els efectes observats indiquen que petits canvis en l'estructura química dels productes d'oxidació dels esterols condicionen l'efecte fisiològic determinat *in vitro*.



**OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

***OBJECTIVES AND WORK PLAN***



## OBJETIVOS / OBJECTIVES

El objetivo general del presente trabajo es el estudio de los esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en esteroides vegetales, así como la evaluación *in vitro* de los efectos biológicos causados por óxidos de esteroides.

La presente tesis doctoral se encuadra en el marco de un proyecto más amplio cuyo objetivo es la evaluación de la idoneidad de una bebida con zumo de frutas y leche enriquecida en esteroides vegetales, evaluando su estabilidad, su biodisponibilidad (*in vitro* e *in vivo*) y el efecto en biomarcadores intermedios de riesgo cardiovascular y remodelado óseo.

Los objetivos específicos son:

-Selección de un ingrediente fuente de esteroides vegetales para el enriquecimiento de bebidas a base de zumo de frutas y/o leche.

-Evaluación de la estabilidad y biodisponibilidad (bioaccesibilidad) de los esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo frutas y leche utilizadas en un estudio de intervención clínica.

-Estudio *in vitro* de los efectos biológicos (citotóxicos y moduladores) de óxidos de esteroides.

The general objective of this study is to investigate plant sterols and their oxides in fruit juice and/or milk enriched beverages, and to carry out an *in vitro* evaluation of the biological effects of these sterol oxides.

This Doctoral Thesis is set within the context of a broader project designed to assess the suitability of a fruit juice and milk based beverage enriched with plant sterols, exploring its stability, bioavailability (*in vitro* and *in vivo*), and effects upon cardiovascular risk and bone remodeling biomarkers.

The specific objectives are the following:

- Selection of a plant sterol source ingredient for the enrichment of fruit juice and/or milk based beverages.

- Evaluation of the stability and bioavailability (bioaccessibility) of the plant sterols and their oxides in fruit juice and milk based beverages used in a clinical intervention study.

- Conduction of an *in vitro* study of the biological (cytotoxic and modulator) effects of plant sterol oxides.



## PLAN DE TRABAJO / WORK PLAN

Para alcanzar los objetivos mencionados se propone el siguiente plan de trabajo:

-Revisión de los antecedentes bibliográficos relativos a la determinación de esteroides vegetales (EV) y sus óxidos (POPs) en zumo y/o leche, su biodisponibilidad y sus efectos biológicos.

-Optimización de la identificación de los POPs por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

-Selección de un ingrediente fuente de EV (EV libres procedentes de *tall oil* o esterificados a partir de una mezcla de aceites vegetales) a utilizar en las bebidas objeto de estudio.

-Evaluación de la estabilidad de EV en bebidas a base de zumo frutas y leche utilizadas en un estudio de intervención clínica.

-Estimación de la bioaccesibilidad de EV y POPs en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en EV.

-Determinación *in vitro* (células Caco-2 y/o HepG2) de los efectos biológicos de 7-cetoderivados de estigmasterol y/o colesterol.

- Citotoxicidad

- Potencial inflamatorio

- Influencia en el metabolismo del colesterol

-Obtención de POPs por termooxidación y separación por cromatografía líquida de alta resolución.

-Evaluación de los resultados obtenidos

-Redacción de la tesis doctoral

To achieve these objectives, the following work plan has been proposed:

- Review of the background literature relating to the determination of plant sterols and their oxides in juice and/or milk based beverages, their bioavailability and biological effects.

- Optimization of plant sterol oxides identification by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

- Selection of a plant sterol source ingredient (free plant sterols from tall oil or esterified plant sterols from a mixture of vegetable oils) for use in the studied beverages.

- Evaluation of plant sterol stability in fruit juice and milk-based beverages used in a clinical intervention study.

- Estimation of the bioaccessibility of plant sterols and their oxides in fruit juice and/or milk-based beverages enriched with plant sterols.

- Determination of the biological effects of 7-ketoderivatives of stigmasterol and/or cholesterol *in vitro* (Caco-2 cells and/or HepG2).

- Cytotoxicity.

- Inflammatory potential.

- Influence upon cholesterol metabolism.

- Obtainment of plant sterol oxides through thermooxidation and separation by high performance liquid chromatography (HPLC).

- Evaluation of the results.

- Drafting of the dissertation.

**ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

***LITERATURE REVIEW***



## **1. Esteroles vegetales**

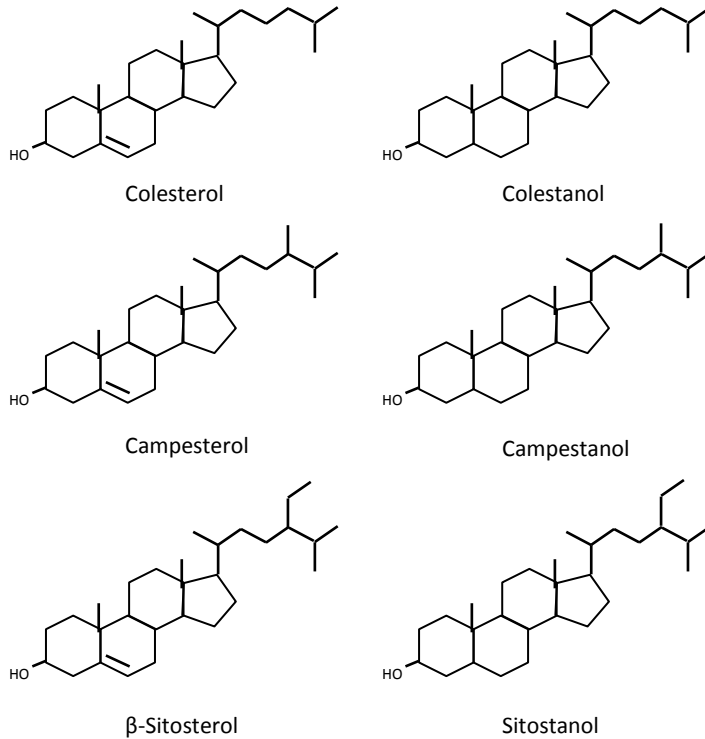
### *1.1 Estructura*

Los esteroles vegetales (EV) (fitoesteroles y fitoestanoles), son compuestos naturales presentes en la fracción insaponificable de alimentos de origen vegetal. Químicamente presentan una estructura similar a la del colesterol (estructura de ciclopentano perhidrofenantreno, con insaturación en el carbono 5 y grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 3 de la estructura esteroidea), incluyendo pequeñas variaciones en la cadena hidrocarbonada lateral (Rozner and Garti, 2006). A diferencia del colesterol, los EV presentan un grupo alquilo (metilo o etilo) en posición C24, incrementando así su carácter lipófilo frente al colesterol (**figura nº 1**). Se han determinado alrededor de 200 tipos diferentes de fitoesteroles, siendo los más abundantes el  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Lagarda et al., 2006).

Los fitoesteroles reducidos, reciben el nombre de fitoestanoles. Se diferencian de sus respectivas formas insaturadas por la reducción química del doble enlace del carbono 5 de la estructura cíclica (ver **figura nº 1**).

Ambos tipos de compuestos pueden encontrarse en la naturaleza en forma libre, esterificada, en forma de glucósidos o glucósidos esterificados con ácidos grasos (Moreau et al., 2002, Lagarda et al., 2006).

Figura nº 1. Estructuras del colesterol y principales esteroides vegetales en alimentos.

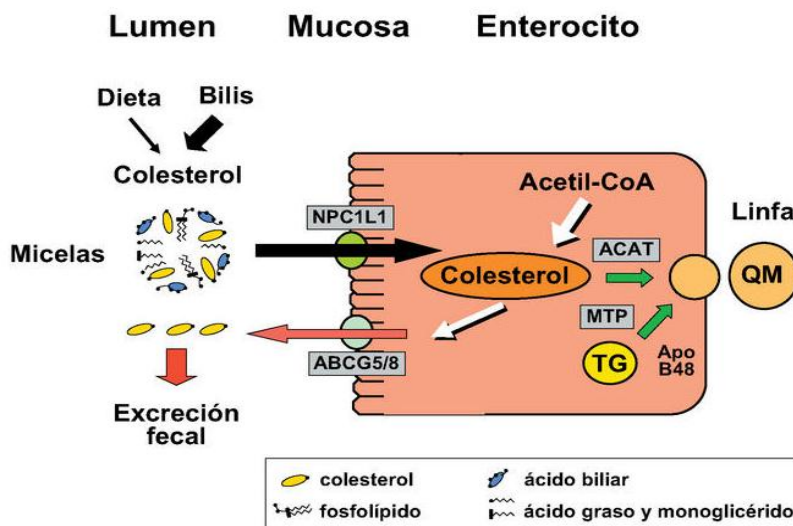


### 1.2 Absorción y metabolismo

Una vez liberados del alimento, para ser absorbidos, los EV siguen la misma ruta de absorción que el colesterol. De la fase lipídica pasan a la fase micelar y se absorben en el lumen intestinal. La transferencia de los EV desde la micela al enterocito se produce a través de una proteína específica situada en la membrana de borde en cepillo, denominada Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1) (Jessup et al., 2008). En el interior del enterocito la acilcoenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT) es la

encargada de esterificar los EV antes de su incorporación a los quilomicrones (QM) y lipoproteínas intestinales para su posterior excreción al torrente sanguíneo (Bartnikowska, 2009). Sin embargo, dada la baja afinidad de la ACAT por los EV, solamente una parte de estos compuestos es esterificada, lo que explica su pobre absorción. Los transportadores dependientes de ATP (ABCG5/ABCG8), situados en la parte apical del enterocito, son los encargados de eliminar los EV no esterificados de vuelta al lumen intestinal (**figura n° 2**).

Figura n° 2. Mecanismo de absorción de los esteroles (Ros, 2006).



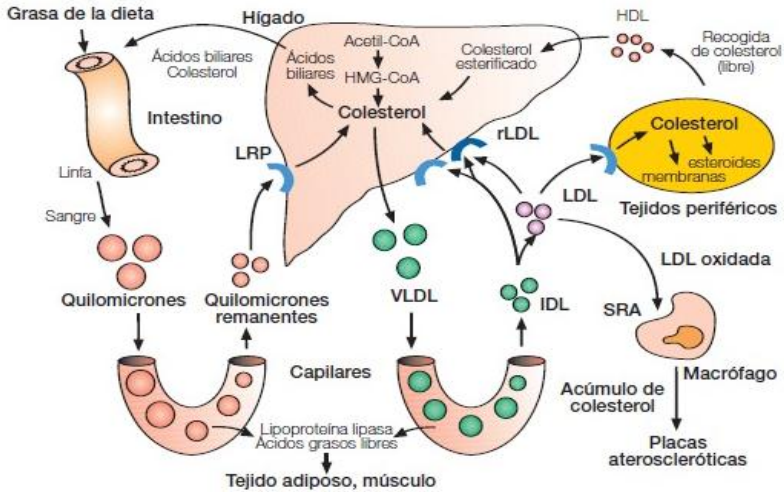
ABCG5/8: transportadores de excreción, ACAT: acilcoenzima A colesterol aciltransferasa, MTP: proteína microsomal transportadora de triglicéridos, NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1, QM: quilomicrones, TG: triglicéridos.

Los esteroides absorbidos, a través de la linfa se incorporan a la circulación en forma de QM (constituidos además por triglicéridos (TG) y apoproteínas). En los tejidos, los QM son hidrolizados liberando ácidos grasos y transfiriendo la mayor parte de apoproteínas a otras lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los QM remanentes, enriquecidos en esteroides, son reconocidos por los receptores hepáticos e internalizados. En el hígado, una parte de los esteroides liberados son excretados por la vía hepatobiliar, bien como ácidos biliares o como esteroides, pudiendo ser, de nuevo, reabsorbidos por el intestino (**figura nº 3**) (Palou et al., 2005).

Por otra parte, las células hepáticas producen y secretan lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), constituidas por TG y esteroides (de origen dietario y endógeno), que son metabolizadas en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) que, a su vez, pueden ser captadas por el hígado o transformadas en lipoproteínas de baja densidad (LDL) (formadas principalmente por esteroides esterificados tras transferir gran parte de apolipoproteínas a las HDL). Las LDL pueden ser acetiladas u oxidadas y captadas por los macrófagos, acumulándose masivamente en su interior y transformándose en células espumosas que desarrollan un papel crítico en el desarrollo de las placas ateroscleróticas y, por tanto, tienen una potencial trascendencia fisiopatológica. Por otra parte, las HDL son las lipoproteínas de menor tamaño y mayor densidad que captan apoproteínas procedentes de otras lipoproteínas y colesterol libre, pudiendo ser transferido, este último, al hígado. Además, participan en el transporte inverso del colesterol y actúan como antioxidantes de las LDL (**figura nº 3**) (Palou et al., 2005).



Figura nº 3. Metabolismo de los esteroides circulantes (Palou et al., 2005).



HMG-CoA: hidroximetilglutaril Coenzima A, HDL: lipoproteínas de alta densidad, IDL: lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: lipoproteínas de baja densidad, LRP: proteína relacionada con el receptor de las LDL, rLDL: receptor LDL, SRA: receptor de las LDL oxidadas, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Se conoce poco sobre el efecto de la microbiota en los EV en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, se ha evaluado su contenido y el de sus derivados esteroideos en heces de animales (Leeming et al., 1996, Batta et al., 2005) y humanos (Eneroth et al., 1964, Lutjohann et al., 1995, Leeming et al., 1996) mostrando que el campesterol y  $\beta$ -sitosterol son metabolizados en metilcoprostanol-metilcoprostanona y etilcoprostanol-etilcoprostanona, respectivamente, al igual como sucede en el caso del colesterol con la formación de coprostanol y coprostanona (Eneroth et al.,

1964, Korpela and Adlercreutz., 1985, Lutjohann et al., 1995, Westrate et al., 1999). Este hecho sugiere que, independientemente de su origen, los diferentes tipos de esteroides sufrirían las mismas transformaciones moleculares en el lumen intestinal.

Los EV son también eliminados por la ruta biliar (Boberg et al., 1990). Sin embargo, los EV no son metabolizados como ácidos biliares normales de 24 átomos de carbono, sino como compuestos polares (derivados de 21 átomos de carbono di y trihidroxilados), que han sido aislados de heces de humanos, primates no humanos y ratas alimentadas con EV (Salen et al., 1970, Kritchevsky et al., 1981, Boberg et al., 1990). Por otra parte, en ratas a las que se les inyectó EV con marcaje radioactivo, se han detectado ácidos biliares con este marcaje en plasma y bilis (Subbiah y Kuksis, 1973), lo que parece sugerir que los EV también son metabolizados para la producción de compuestos ácidos.

### *1.3 Funciones fisiológicas*

Los EV han sido asociados con diferentes funciones fisiológicas que se detallan a continuación:

#### *Estructural*

En las sustancias de origen vegetal, los EV, al igual que el colesterol en los organismos animales, desempeñan una función estructural estabilizando las bicapas lipídicas. Forman parte de las membranas celulares y, dado que cada EV tiene unas propiedades estructurales diferentes, la relación entre ellos determina la fluidez de dichas

membranas (Quílez et al., 2003a, Rozner and Garti, 2006). Esta función estructural induce a pensar que los EV podrían afectar a las propiedades de las membranas celulares en organismos animales. Sin embargo, se ha demostrado que el  $\beta$ -sitosterol no presenta efectos sobre la fluidez de las membranas de queratocitos humanos (Mora et al., 1999), si bien otros estudios muestran un efecto deletéreo en las membranas de glóbulos rojos de ratas hipertensas debido a un incremento en la incorporación de EV, asociando este hecho a una menor esperanza de vida de estos animales (Ratnayake et al., 2000). No obstante, la extrapolación de estos resultados al caso de los humanos no parece ser del todo evidente (Palou et al., 2005).

#### *Hipocolesterolémico*

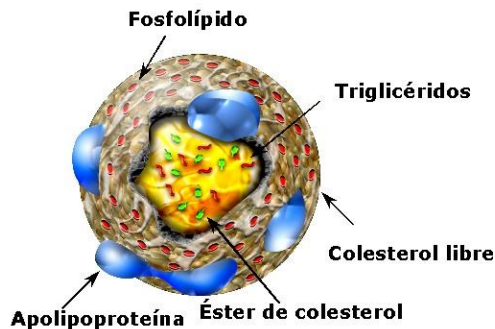
Diversos estudios indican el efecto beneficioso de los EV asociado, principalmente, con la disminución de la absorción intestinal del colesterol, con la correspondiente reducción del colesterol LDL y, en consecuencia, de la colesterolemia (De Jong et al., 2003), reduciendo así el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis. Además, se ha descrito que dicha reducción se produce sin la alteración de los niveles de colesterol HDL y de TG (Jones and AbuMweis, 2009).

Los efectos fisiológicos de los EV sobre la absorción del colesterol se atribuyen a la similitud estructural entre ambos tipos de esteroides y a la mayor extensión y complejidad de la cadena lateral de los EV, que incrementa su carácter lipófilo frente al colesterol.

Se han propuesto distintos mecanismos de acción de los EV sobre la absorción intestinal del colesterol (Trautwein et al., 2003, García-Llatas and Rodríguez-Estrada, 2011):

a) Competencia entre ambos tipos de esteroides por su incorporación a la micela mixta intestinal (compuesta de sales biliares, monoacilglicerol, ácidos grasos libres, lipofosfolípidos, fosfolípidos y colesterol libre) para solubilizarse (**figura nº 4**). Los EV, debido a su mayor hidrofobicidad, disminuyen la incorporación del colesterol a las micelas y, por tanto, su absorción (Ikeda et al., 1988).

Figura nº 4. Componentes de la micela mixta.



Además, se ha propuesto un fenómeno de cocrystalización de ambos tipos de esteroides y precipitación de estos durante la lipólisis de los alimentos en el tracto gastrointestinal (Christiansen et al., 2001). Sin embargo, Mel'nikov et al. (2004) indican que este mecanismo no representaría un alto impacto en la reducción sérica del colesterol debido a la alta solubilidad de los esteroides libres en los productos de hidrólisis de los lípidos.

b) Competición por las proteínas transportadoras de colesterol, como la NPC1L1, situada en la membrana de borde en cepillo (**figura nº 2**) e involucrada en la internalización de esteroides al enterocito. Se ha demostrado que, células intestinales humanas (FH 74) tratadas con  $\beta$ -sitosterol (250  $\mu$ M) disminuyen la expresión relativa de ARN y la síntesis proteica de NPC1L1 (Jesch et al., 2009). Dado que las estructuras de ambos tipos de compuestos son similares, los EV pueden ser transportados en lugar del colesterol reduciendo su captación.

c) Regulación positiva de la expresión de los transportadores ABCG5/8 situados en la membrana apical del enterocito (**figura nº 2**), encargados de liberar los esteroides en exceso al lumen intestinal, generando así un aumento de la excreción de colesterol (Yu et al., 2002).

d) Inhibición de la actividad de ACAT. Este enzima reesterifica el colesterol absorbido a través de la mucosa intestinal (Trautwein et al., 2003) (**figura nº 2**). Si bien la esterificación de EV es menor que la del colesterol (Field and Mathur, 1983), la presencia de éstos origina una ligera supresión en la actividad de la ACAT, lo que origina una reducción de la captación del colesterol.

e) Disminución de la expresión relativa de la hidroximetilglutaril Coenzima A reductasa (HMGCoA), enzima encargada de la síntesis endógena de colesterol (Field et al., 1997), principalmente a nivel hepático.

f) Una vez esterificados, los EV pueden interferir en la incorporación del colesterol en los QM (Trautwein et al., 2003). Esta etapa es clave en la transferencia de esteroides de los enterocitos a la linfa. Alrededor de un 70-80% del colesterol es esterificado, lo que apoya que la incorporación a los

QM dependa principalmente de la etapa de esterificación (Ikeda et al., 1988, Ho and Pal, 2005).

g) Recientemente, DeSmet et al. (2012) han propuesto un nuevo mecanismo por el que los EV pueden reducir la cantidad de colesterol en sangre, mediante la secreción directa del colesterol desde la circulación al lumen intestinal, cuya incidencia se ve estimulada por la presencia de EV. A su vez, este mecanismo aumenta la pérdida de esteroides neutros. No se conoce exactamente la ruta por la cual se observa este proceso, sin embargo, se especula que está mediado, en parte, por los transportadores ABCG5/8 (Brufau et al., 2011).

Probablemente, no un mecanismo aislado sino la suma de diversos efectos son los responsables del efecto hipocolesterolémico de los EV.

Independientemente del mecanismo involucrado, los estudios clínicos en sujetos sin o con hipercolesterolemia moderada o alta, que ingieren alimentos enriquecidos en EV (1,1 - 4 g/día), muestran, en general una disminución del colesterol total y LDL sin afectar a los niveles de HDL ni de TG, lo que corrobora el efecto hipocolesterolémico de los EV. Este efecto se ha indicado en diferentes revisiones (Calpe-Berdiel et al., 2009, Jones and Abumweis 2009, Marangoni and Poli, 2010, Rudkowsda, 2010).

### *Anticancerígena*

Los EV se han relacionado con la protección frente diferentes tipos de cáncer (revisados en Awad and Fink, 2000, Bradford and Awad, 2007, Woyengo et al., 2009). Sin embargo, aunque el número de estudios es limitado y la relación estadística entre la ingesta de EV y la baja

incidencia de algunos cánceres no indica un relación causal, las evidencias epidemiológicas sugieren que los EV pueden ejercer dicho efecto protector (Trautwein and Demonty, 2007). En estudios *in vitro* se ha demostrado la influencia de los EV en el cáncer de: colon (HT-29, HT116) (Awad et al., 1996, 1998, Choi et al., 2003, Jayaprakasha et al., 2010), próstata (LNCaP, PC-3, DU145) (von Holtz et al., 1998, Awad et al., 2000a, 2001, Ifere et al., 2009, 2010), mama (MDA-MB-231, MCF-7) (Downie et al., 1999, Awad et al., 2003, Ju et al., 2004, Awad et al., 2007, 2008), y estómago (SGC-790) (Zhao et al., 2009). Por otro lado, en ensayos *in vivo* (ratas, ratones y humanos), se ha evaluado el efecto protector de los EV en el cáncer de: colon (Raicht et al., 1980, Janezic and Rao, 1992, Awad et al., 1997), mama (Awad et al., 2000b, 2001b, Ju et al., 2004, Llaverias et al., 2013), próstata (Awad et al., 2001a), pulmón (Mendilaharsu et al., 1998), ovarios (McCann et al., 2003), esófago (De Stefani et al., 2000a) y estómago (De Stefani et al., 2000b).

El mecanismo por el cual ejercen esta protección no se conoce completamente, sin embargo, se han propuesto algunas teorías (Awad and Fink, 2000, Bradford and Awad, 2007). Uno de estos mecanismos es la modificación de la cinética del ciclo celular (Choi et al., 2003), puesto que se ha demostrado que muchos fitoquímicos pueden tener efectos anticancerosos al inhibir la progresión del ciclo celular desregulando algunas etapas (arresto en la fase M, incremento en la población subG1) y promocionando de la apoptosis de células tumorales (Awad et al., 2000a, 2000b, 2005a) mecanismo que podría ser explicado, al menos en parte, por la inducción del metabolismo de esfingolípidos (involucrado en el proceso de tumorigénesis) estimulando la formación de ceramida (Awad et al.,

1996, Awad et al., 2004, 2005b) que favorecería la alteración de los mecanismos de transducción de señales, el arresto celular y la apoptosis mediada por los EV (Wolff et al., 1994, Awad et al., 2004, 2005b, Bradford and Awad, 2010).

La influencia de los EV en el sistema hormonal puede también contribuir a sus acción anticancerígena (Bradford and Awad, 2007). Sin embargo, hay pruebas contradictorias acerca de la actividad estrogénica de los EV, mostrando, en algunos casos, que estos compuestos pueden actuar como moduladores de receptores estrogénicos *in vitro* (MVLN, HGELN) (Gutendorf and Westendorf, 2001), mientras que en otros estudios, tanto *in vitro* (MCF-7, receptores de estrógenos de rata) como *in vivo* (ratas), no se observa dicho efecto (Turnbull et al., 1999, Baker et al., 1999). Por otra parte, los EV podrían inhibir la adhesión, invasión, y la migración de células cancerosas (Awad et al., 2000b, 2001a, 2001b), previniendo la metástasis tumoral.

La modulación de la función inmune podría estar también involucrada en el proceso anticancerígeno (Trautwein and Demonty, 2007), mediante el incremento de la sensibilidad de los linfocitos T (Bouic et al., 2001), la estimulación de la proliferación linfocitaria (Bouic et al., 1996) o la secreción de leucotrienos y prostaglandinas (Othman and Moghadasian, 2011). Finalmente, los EV podrían desempeñar un papel importante en la prevención del cáncer de colon mediante la modificación, en su presencia, del nivel de esteroides fecales debido a la conversión de colesterol y los ácidos biliares a coprostanol y ácidos biliares secundarios en el intestino (Awad and Fink, 2000, Jones and AbuMweis, 2009).



La elucidación del mecanismo mediante el cual los EV modulan el crecimiento y la apoptosis podría revelar dianas potenciales de prevención de distintos tipos de cáncer y/o intervención quimioterapéutica ya que se ha determinado que, para dietas ricas en fitoquímicos (entre los que se encontrarían los EV) se estima una reducción del riesgo de padecer cáncer de alrededor de 20% (Bradford and Awad, 2007).

#### *Antiinflamatoria/inmunomoduladora*

En general, la cascada inflamatoria empieza con la producción de citoquinas pro-inflamatorias, entre otros tipos de moléculas (quimioquinas, y moléculas de adhesión) (Ryan et al., 2009), como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y la interleuquina (IL)-1 $\beta$ . Estas citoquinas, junto con factores procedentes de otras vías de activación, tales como receptores de tipo *Toll* o *dectin-1*, activan la quinasa I $\kappa$ B que induce la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma. Este hecho permite la translocación del factor de transcripción nuclear  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) al núcleo celular, promoviendo la transcripción de genes codificantes de otras proteínas inflamatorias (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , por ejemplo) y alterando las concentraciones séricas de proteínas involucradas en la fase aguda de la respuesta inmune (Brüll et al., 2009). Paralelamente, estas moléculas pueden alterar la función endotelial, aumentando la expresión de moléculas de adhesión, incrementando la adhesión leucocitaria y alterando las respuestas vasodilatadoras endoteliales (Othman and Moghadasian, 2011).

Diversos estudios muestran la relación entre los EV y el efecto anti-inflamatorio.

En estudios *in vitro*, los EV han demostrado alterar la producción de diversos biomarcadores de inflamación. En macrófagos JJ774A.1 estimulados con lipopolisacáridos y expuestos a  $\beta$ -sitosterol (1 - 16  $\mu$ M) se observa una disminución de la producción de IL-6, TNF $\alpha$ , interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), además de un incremento de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Valerio and Awad, 2011). Recientemente, se ha investigado el efecto de EV (25-100  $\mu$ M) obtenidos a partir de aceite de *Evening Primrose* en macrófagos peritoneales estimulados con lipopolisacáridos, mostrando que estos compuestos disminuyen la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el tromboxano B<sub>2</sub>, indicando la propiedad antiinflamatoria de los EV (Montserrat-de la Paz et al., 2012). Sin embargo, otros estudios muestran que los EV (160  $\mu$ M) incrementan la producción de IL-6 y TNF $\alpha$  en macrófagos, contradiciendo los efectos previamente mencionados (Kurano et al., 2011).

Estudios *in vivo* también han demostrado un efecto antiinflamatorio de los EV. En ratones deficientes en apoE alimentados con una dieta enriquecida en EV (2%, p/p), cambios en las lesiones ateroscleróticas se han asociado con la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF $\alpha$  y el incremento de la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Nashed et al., 2005). Contrariamente, en este mismo tipo de animales y en ratones C57BL/6J, se ha observado que la ingesta de EV (2%, p/p), produce un incremento en IL-2 y INF $\gamma$ , manteniéndose los niveles de IL-4 y IL-10 (Calpe-Berdiel et al., 2007). Por otra parte, en humanos se ha indicado que la administración de EV (1,7 g/día) disminuye la secreción de PAI-1 (inhibidor del activador del

plasminógeno-1) sin alterar los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF $\alpha$  (Jones et al., 2007). Contrariamente, se ha indicado que la suplementación de un zumo de naranja con EV (2 g/día) disminuye la concentración de IL-1 $\beta$  y IL-6 en suero (Devaraj et al., 2011). Por otro lado, se ha observado que la ingesta de EV (1-3g/día) disminuye el nivel de la proteína C reactiva (CRP) (Jenkins et al., 2003, 2005, Clifton et al., 2008), cuyo nivel aumenta durante los procesos inflamatorios debido al aumento en IL-6, lo que es contrario a los resultados obtenidos por otros autores (Hansel et al., 2007, Madsen et al., 2007, De Jong et al., 2008, Plat et al., 2009), quienes no observan efecto de los EV (1,6 - 2,5g/día) en los niveles de CRP ni sobre la MCP-1 (De Jong et al., 2008, Plat et al., 2009). Se ha evaluado el efecto sinérgico de los EV (2 g/día) con los ácidos grasos omega-3 (1,4 g/día) mostrando una reducción en CRP, TNF $\alpha$ , IL-6 y leucotrieno B<sub>4</sub> (Micallef and Garg, 2009).

Teniendo en cuenta que la inflamación es fundamental en todas las fases de la aterosclerosis, la intervención dietética con EV, podría disminuir la secreción de citoquinas proinflamatorias y representaría una estrategia atractiva para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Libby and Ridker, 2004).

Se requiere un mayor número de estudios para esclarecer los mecanismos mediante los cuales los EV ejercen su influencia en el proceso inflamatorio así como su interacción/modificación del sistema immune (Othman and Moghadasian, 2011), puesto que este efecto anti-inflamatorio ha sido ligado a una *actividad inmunomoduladora*.

Diversos estudios han sugerido la influencia de los EV como moduladores de la función immune, mediante, por ejemplo, la

estimulación de la proliferación de linfocitos sanguíneos *in vitro* por el  $\beta$ -sitosterol y su glucósido (Bouic et al., 1996). A su vez, se ha indicado el incremento de respuesta de los linfocitos T tras exposición (tanto *in vitro* como *in vivo*) a mezclas de esteroides, lo que sugiere una posible estimulación del sistema inmune (Bouic, 2001) mediante la implicación de las células asesinas naturales (células “natural killer”), sin embargo el mecanismo por el cual se produce este fenómeno es desconocido (Brüll et al., 2009).

#### *Efecto sobre los antioxidantes lipófilos*

Dada su naturaleza lipófila, se ha demostrado que los EV pueden interferir en la absorción de diferentes carotenoides y tocoferoles puesto que éstos compuestos antioxidantes son también transportados en las lipoproteínas. Se ha sugerido que la reducción sérica de los carotenoides hidrocarbonados ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno) tras la ingesta de EV, está asociada con la disminución de la absorción de colesterol, mientras que los cambios séricos en los carotenoides oxigenados (luteína, zeaxantina y criptoxantina) y en los tocoferoles está principalmente asociada con la disminución de la concentración de colesterol LDL en suero (Plat and Mensink 2001).

#### *Efecto sobre la agregación plaquetaria*

Los estudios relativos al efecto de los EV sobre la agregación plaquetaria son escasos y, en muchos casos contradictorios. En estudios con humanos se ha observado que, tras la ingesta de una dieta enriquecida en EV (2,6 g/día), existe un aumento de la concentración de fibrinógeno

en plasma (Kozłowska-Wojciechowska et al., 2003). Sin embargo, en otros estudios los niveles de fibrinógeno no se ven alterados tras la administración de EV (1,82 g/día) (Mussner et al., 2002). En base a las evidencias científicas sobre dicho efecto, no es posible concluir que los EV afecten a los parámetros de coagulación, por tanto, se requieren más estudios para esclarecer la influencia de estos compuestos en la agregación plaquetaria (Derdemezis et al., 2010).

#### *1.4 Contenidos en alimentos e ingestas a partir de la dieta*

Los EV son componentes minoritarios de los lípidos procedentes de alimentos de origen vegetal comprendiendo la mayor proporción de la fracción insaponificable de grasas. Estos compuestos aparecen en forma libre, esterificados con ácidos grasos, glucósidos, y glucósidos con ácidos grasos. Los EV no pueden ser sintetizados por los organismos animales, por lo que son obtenidos a través de la dieta, principalmente por el consumo de aceites, margarinas, cereales y derivados, legumbres, hortalizas, frutas y frutos secos. En el **cuadro nº 1** se muestran los contenidos de EV en diferentes alimentos de origen vegetal. Tal y como se observa, los aceites son los más abundantes en EV seguidos por los frutos secos, legumbres y cereales. En general, las frutas y hortalizas son los grupos de alimentos que menos EV contienen.

Cuadro n° 1. Contenido de esteroles vegetales (mg/100g) en alimentos.

<b>Alimento</b>	<b>Contenido</b>	<b>Alimento</b>	<b>Contenido</b>
Aceites: cártamo <sup>1-2</sup>	192 – 444	Pan integral <sup>5</sup>	86
colza <sup>2-3</sup>	700 – 736	Pasta cocinada <sup>10</sup>	36
coco <sup>2</sup>	70	Almendra <sup>1,6,8,11-12</sup>	89 – 174
girasol <sup>1-6</sup>	263 – 725	Avellana <sup>6,8,11</sup>	54 – 128
maíz <sup>1-3</sup>	700 – 952	Cacahuete <sup>6,11-12</sup>	65-144
oliva <sup>1-3,6</sup>	156 – 236	Nuez <sup>6,8,11</sup>	63 – 145
palma <sup>1-2,4</sup>	49 – 79	Piñones <sup>8</sup>	202
sésamo <sup>2</sup>	498	Pistacho <sup>6,8</sup>	243 – 254
soja <sup>1-3,5</sup>	140 – 300	Alubia blanca <sup>6</sup>	108
Grasa de leche <sup>7</sup>	6	Frijoles <sup>1</sup>	76
Manteca de cacahuete <sup>8</sup>	137	Garbanzos <sup>6</sup>	121
Manteca de cerdo <sup>2</sup>	5	Lentejas <sup>6</sup>	117
Margarina <sup>3,7</sup>	130 – 540	Acelgas <sup>6</sup>	17
Chocolate <sup>8</sup>	164	Ajo <sup>6</sup>	18
Arroz <sup>6,9</sup>	29	Alcachofa <sup>6</sup>	49
Arroz integral <sup>9</sup>	72	Berenjena <sup>6</sup>	6
Centeno <sup>3,9</sup>	82 – 100	Cebolla <sup>6,12</sup>	7 – 9
Maíz <sup>1</sup>	70	Col <sup>6</sup>	27
Trigo <sup>1,3</sup>	69 – 70	Coliflor <sup>3,6</sup>	44 – 200
Avena <sup>3</sup>	50	Espinacas <sup>6,12</sup>	10 – 16
Cebada <sup>3,9</sup>	60-80	Lechuga <sup>1,6</sup>	14 – 38
Copos de maíz <sup>9-10</sup>	26 – 38	Patata <sup>3,6</sup>	4 – 25
Copos de trigo <sup>10</sup>	68	Perejil <sup>6,12</sup>	7 – 29
Germen de trigo <sup>8, 10</sup>	344 – 347	Pimiento verde <sup>6</sup>	9
Pan blanco <sup>5-6, 9-10</sup>	41 – 50	Tomate <sup>1,6,12</sup>	7 – 10
Pan centeno <sup>5,9-10</sup>	50 – 90	Zanahoria <sup>6,12</sup>	15 – 19

Cuadro n° 1 (continuación). Contenido de esteroides vegetales (mg/100g) en alimentos.

Alimento	Contenido	Alimento	Contenido
Aceituna <sup>6</sup>	37	Mandarina <sup>6</sup>	22
Aguacate <sup>3,12</sup>	75 – 100	Manzana <sup>1,3,6,12</sup>	12 – 30
Arándanos <sup>3</sup>	20 – 30	Naranja <sup>6,12</sup>	23 – 30
Banana <sup>1,6,12</sup>	12 – 20	Pera <sup>6</sup>	11
Frambuesa <sup>3</sup>	20 – 30	Sandía <sup>6</sup>	5
Fresa <sup>6</sup>	11	Uva blanca <sup>3,6</sup>	20 – 33

1: Ostlund et al., 2002, 2: Phillips et al., 2002, 3: Piironen et al., 2000b, 4: Dutta and Appelqvist, 1996, 5: Normén et al., 2003, 6: Jiménez-Escrig et al., 2006, 7: Contarini et al., 2002, 8: Phillips et al., 2005, 9: Piironen et al., 2002, 10: Normén et al., 2002, 11: Maguire et al., 2004, 12: Piironen et al., 2003.

Los EV mayoritarios son los fitoesteroides, que constituyen el 95% del total de estos compuestos, siendo el 80%  $\beta$ -sitosterol y el 15% restante campesterol y estigmasterol, fundamentalmente (Jiménez-Escrig et al., 2006, Lagarda et al., 2006).

Los EV saturados o fitoestanoles, en proporción inferior, representan únicamente el 5% del total de estos compuestos. Sin embargo, estas proporciones varían entre alimentos. A modo de ejemplo, en el **cuadro n° 2** se detallan los contenidos individuales de los principales EV en alimentos de origen vegetal comúnmente consumidos en países como España, Suecia, Holanda o Estados Unidos.

Cuadro n° 2. Contenidos individuales de esteroles vegetales (mg/100g) en alimentos.

Alimento	$\beta$ -Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	Brasicasterol	Sitostanol	Campestanol
Aceites: cártamo <sup>1</sup>	120,7	28,2	14,8	nd	9,6	2,6
colza <sup>1</sup>	381,6	221,05	3	85,7	2,1	0,5
coco <sup>1</sup>	40,1	5,6	10,9	nd	0,25	1,5
girasol <sup>1-4</sup>	194,2 - 260	27,1 - 45,2	8,2 - 40	2,1	2,9 - 10,6	1,2
maíz <sup>1</sup>	486,2	131,5	55,4	nd	14,9	9,7
oliva <sup>1,4</sup>	121,0 - 125,8	4,3 - 6,2	2,5 - 5,2	nd	3,1 - 4,2	0,7
palma <sup>1-2</sup>	39,5 - 43,8	14,8 - 22,7	5,9 - 8,7	nd	< 0,5	nd
sésamo <sup>1</sup>	333,3	75,5	34,9	nd	1,9	1,4
soja <sup>1,3</sup>	80 - 140,6	30 - 45,5	30 - 49,1	nd	4,2	2,2
Grasa de leche <sup>4</sup>	2,3					
Manteca de cacahuete <sup>5</sup>	88,7	16,3	11,4		1,05	2,2
Manteca de cerdo <sup>1</sup>	nd	0,5	nd	< 0,5	nd	0,5
Margarina <sup>6</sup>	97,7	63,2	5,4	14,6		
Chocolate <sup>5</sup>	103,9	14,1	39,8		<1,7	2,7
Avena <sup>7</sup>	36,73	10,6	2,3	1,9	0,93	0,4
Centeno <sup>7</sup>	42,03	14,35	2,63	0,75	11,05	7,4
Arroz <sup>4,7</sup>	19,5 - 19,8	4,5 - 4,6	3 - 3,2		nd - 1,7	1,3
Arroz integral <sup>7</sup>	37,5	14,6	10,4		1,7	1,6
Copos de maíz <sup>7-8</sup>	17 - 22,4	4,3 - 5,8	1 - 1,3		3,3 - 6	0,9 - 1,8
Copos de trigo <sup>8</sup>	38	11	1,7		9,9	7
Germen de trigo <sup>5,8</sup>	228,6 - 230	78,7 - 94	3,2 - 3,9		6,9 - 9,9	6,9 - 12,7



Cuadro n° 2 (continuación). Contenidos individuales de esteroides vegetales (mg/100g) en alimentos.

Alimento	$\beta$ -Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	Brasicasterol	Sitostanol	Campestanol
Pan blanco <sup>3-4,7-8</sup>	23,9 - 31	7,7 - 12	0,6 - 1,1	0,7	3 - 3,9	2,1 - 2,7
Pan centeno <sup>3,7-8</sup>	27,5 - 45,8	11-16	2,2 - 2,9	2,5	5 - 9,9	2,5 - 7,5
Pan integral <sup>3</sup>	47,1	16,9	2,9		10,3	8,8
Pasta cocinada <sup>8</sup>	22	6,1	0,5		4,5	3,3
Almendra <sup>4-5,9-10</sup>	84,5 - 143,4	2,2 - 4,9	nd - 5		1,4 - 3,2	3,3
Avellana <sup>4-5,9</sup>	48,8 - 110,9	3,3 - 6,9	1,8 - 2,5		4	3
Cacahuete <sup>4,9-10</sup>	51,7 - 99,4	7,5 - 19	6,2 - 14,5		1,4 - 6,9	
Nuez <sup>4-5,9</sup>	57,4 - 101,7	2,6 - 5,3	nd - 2,8		0,7 - 1,7	2,4
Piñones <sup>5</sup>	132	19,8	< 1,7		5,9	3,8
Pistacho <sup>4-5</sup>	201,9 - 205,9	10,1 - 12,2	2,3		1,2 - 5,9	5
Alubia blanca <sup>4</sup>	56,3	4	35,2		1	
Garbanzos <sup>4</sup>	84,1	12,4	8,3		10,5	
Lentejas <sup>4</sup>	80,8	10	10,8		8,4	

nd: no detectado. 1: Phillips et al., 2002, 2: Dutta and Appelqvist, 1996, 3: Normén et al., 2003, 4: Jiménez-Escrig et al., 2006, 5: Phillips et al., 2005, 6: Contarini et al., 2002, 7: Piironen et al., 2002, 8: Normén et al., 2002, 9: Maguire et al., 2004, 10: Piironen et al., 2003.

Los grupos de alimentos no contemplados en el **cuadro n° 2** (hortalizas y frutas), menos ricos en EV, presentan contenidos de estos compuestos que oscilan entre 1,2 y 28,5 (mg/100 g) de  $\beta$ -sitosterol, 0,1 y 11,1 de campesterol y de no detectado a 15,1 de estigmasterol (Piironen et al., 2003, Jiménez-Escrig et al., 2006).

### *1.5 Alimentos enriquecidos en esteroides vegetales*

Se ha estimado la ingesta dietética de EV (mg/día) en diferentes poblaciones, determinando un aporte de entre: 170 – 228 en USA (Ahrens and Boucher, 1978, de Vries et al., 1997), 400 en Méjico (Cerqueira et al., 1979), 208 – 373 en Japón (Hirai et al., 1986, de Vries et al., 1997), 215 – 272 en Croacia (de Vries et al., 1997), 218 – 305 en Finlandia (de Vries et al., 1997, Valsta et al., 2004), 325 – 358 en Grecia (de Vries et al., 1997), 146 – 307 en Holanda (de Vries et al., 1997, Schothorst and Jekel, 1999, Normén et al., 2001), 179 – 220 en Italia (de Vries et al., 1997), 242 – 255 en Serbia (de Vries et al., 1997), 241 – 349 en España (Jiménez-Escrig et al., 2006, Escurriol et al., 2009) y 218 – 280 en Bélgica (Sioen et al., 2011). Por otro lado, la ingesta de EV en la cultura asiática y en las dietas vegetarianas/veganos puede alcanzar hasta 1g/día (Piironen et al., 2000a). En la dieta española, se ha calculado la contribución relativa de los distintos grupos de alimentos a la ingesta total de EV, siendo del 39% para los aceites, 30% cereales, 12% frutas, 9% legumbres, 7% vegetales y alrededor del 2,5 % frutos secos (Jiménez-Escrig et al., 2006).

Para obtener una reducción significativa del colesterol en sangre (10-15 %), se recomienda una ingesta diaria de EV de alrededor de 2-3 g.

(Katan et al., 2003, Quílez et al., 2003a, Kritchevsky and Chen, 2005). Dado que no es posible alcanzar estas ingestas recomendadas de EV con la dieta habitual, se han enriquecido con EV distintos tipos de alimentos. Este hecho se traduce en más de 40 patentes y 15 productos enriquecidos y comercializados en el mundo (García-Llatas and Rodríguez-Estrada, 2011).

En general, los alimentos grasos han constituido el principal vehículo alimentario para el aporte de EV (dada la naturaleza lipófila de estos compuestos) siendo la margarina el primer alimento enriquecido por razones tecnológicas (Miettinen et al., 1995). En general, se han enriquecido margarinas u otros productos untables (Gylling et al., 1999, Maki et al., 2001, Nestel et al., 2001, Mezine et al., 2003, Amundsen et al., 2004, Wolfs et al., 2006, Schiepers et al., 2009, Clement et al., 2010, Heggen et al., 2010, Barnsteiner et al., 2011, Husche et al., 2011), derivados cárnicos (Laakso, 2005), queso (Laakso, 2005), productos de repostería (Quílez et al., 2003b, Brufau et al., 2004), pan (Nestel et al., 2001, Clifton et al., 2004, Clement et al., 2010), cereales para el desayuno (Nestel et al., 2001, Clifton et al., 2004), pasta (Laakso, 2005, Salo and Wester, 2005), barritas de cereales (Yoshida et al., 2006, Bohn et al., 2007) o de chocolate (Polagruto et al., 2006).

Este hecho es contrario a las recomendaciones dietéticas actuales, orientadas hacia un menor consumo de grasas. Por ello, se han propuesto otras matrices alimentarias (principalmente lácteas) bajas en grasa para su para ser enriquecidas, como por ejemplo, leche (Pouteau et al., 2003, Clifton et al., 2004, Thomsen et al., 2004, Noakes et al., 2005, Laakso, 2005, Gonçalves et al., 2007, Seppo et al., 2007, Menéndez-Carreño et al.,

2008, Mannarino et al., 2009, Bañuls et al., 2010, Clement et al., 2010, Hernández-Mijares et al., 2010, Barnsteiner et al., 2011, Saraiva et al., 2011, Casas et al., 2012, González-Larena et al., 2012) leches fermentadas (Mensink et al., 2002, Clifton et al., 2004, Noakes et al., 2005, Laakso, 2005, Salo and Wester, 2005, Doornbos et al., 2006, Korpela et al., 2006, Hansel et al., 2007, Seppo et al., 2007, Plana et al., 2008, Barnsteiner et al., 2011, Saraiva et al., 2011, Sialvera et al., 2012), quesos bajos en grasa (Korpela et al., 2006), bebidas a base de zumo de frutas (Mezine et al., 2003, Devaraj et al., 2004, Laakso, 2005, Devaraj et al., 2006, Bohn et al., 2007, Clement et al., 2010, Devaraj et al., 2011, González-Larena et al., 2012) o de soja (Weidner et al., 2008, Rideout et al., 2009), como alimentos con mejor perfil nutricional. Se ha demostrado que estos alimentos reducen el colesterol LDL comparable a los productos con mayor contenido lipídico (Jones and AbuMeis, 2009). A modo de ejemplo, en el enriquecimiento de cuatro matrices diferentes (pan, cereales para el desayuno, leche con bajo contenido graso y yogur) se ha observado que, a pesar de la disminución significativa del colesterol en todos los casos, la leche es 3 veces más eficiente que el pan o los cereales, concluyendo que la incorporación de los EV en las membranas de los glóbulos de leche, podrían facilitar su biodisponibilidad para su transporte e incorporación a las micelas (Clifton et al., 2004).

Desde el año 2000 se han ido autorizando y comercializando en la Unión Europea distintos alimentos enriquecidos con EV mediante las correspondientes Decisiones de la Comisión y con arreglo al Reglamento nº 1997/258/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios (ver **cuadro nº 3**). Estas

decisiones han sido recopiladas recientemente por la AESAN (2012). En todas ellas, se establecen los porcentajes máximos de los distintos EV permitidos ( $\beta$ -sitosterol < 80 %, sitostanol < 15%, campesterol < 40 %, campestanol < 5 %, estigmasterol < 30 %, brasicasterol < 3 %, otros esteroides y estanoles < 3 %). Además, se indica que “Los productos se presentarán de forma que puedan dividirse fácilmente en porciones que contengan bien 3 gramos como máximo (en el caso de una porción diaria), o bien 1 gramo como máximo (en el caso de tres porciones diarias) de fitoesteroides o fitoestanoles añadidos”. En otros países como Canadá, Estados Unidos y Nueva Zelanda, se permite además el enriquecimiento de bebidas a base de zumo de frutas.

Recientemente, se ha establecido una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños (Reglamento nº 2009/983/CE, 2012/432/CE) en las que se indica que los fitoesteroides y fitoestanoles contribuyen a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo (ver **cuadro nº 4**).

Cuadro nº 3. Legislación relativa a los alimentos enriquecidos en esteroides vegetales permitidos en la Unión Europea.

<b>Alimento</b>	<b>Forma de EV</b>	<b>Decisión de la Comisión</b>
Grasas amarillas para untar <sup>1,2</sup>	Ésteres de fitoesteroides	2000/500/CE
Grasas amarillas, aliños de ensaladas que contengan mayonesa y bebidas de fruta a base de leche, productos tipo yogur y productos tipo queso <sup>1,2</sup>	Fitoesteroides o fitoestanoles	2004/333/CE
Grasas amarillas, productos tipo leche, productos tipo yogur y salsas aromáticas <sup>1,2</sup>	Fitoesteroides o fitoestanoles	2004/334/CE
Productos tipo leche y tipo yogur <sup>2</sup>	Ésteres de fitoesteroides	2004/335/CE
Grasas amarillas, bebidas de fruta a base de leche, productos tipo yogur y productos tipo queso <sup>1,2</sup>	Fitoesteroides o fitoestanoles	2004/336/CE
Bebidas a base de leche <sup>1,2</sup>	Fitoesteroides o fitoestanoles	2004/845/CE
Pan de centeno <sup>1,2</sup>	Fitoesteroides o fitoestanoles	2006/58/CE
Aceite <sup>2</sup>	Fitoesteroides o fitoestanoles	2007/343/CE
Bebidas de arroz <sup>1</sup>	Fitoesteroides o fitoestanoles	2008/36/CE

<sup>1</sup>: como nuevo alimento, <sup>2</sup>: como nuevo ingrediente alimentario. \*: Determinado por GC-FID o método equivalente. EV: esteroides vegetales.

Cuadro nº 4. Declaraciones permitidas de propiedades saludables.

Nutriente	Declaración	Condiciones de uso
Fitoesteroles: esteroides extraídos de plantas, libres o esterificados con ácidos grasos para uso alimentario <sup>1</sup>	Se ha demostrado que los fitoesteroides disminuyen/reducen la colesterolemia. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria mínima de 2 gramos de fitoesteroides.
Ésteres de fitoestanol <sup>1</sup>	Se ha demostrado que los ésteres de fitoestanol disminuyen/reducen la colesterolemia. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria mínima de 2 gramos de fitoestanoles.
Fitoesteroides y fitoestanoles <sup>2</sup>	Los fitoesteroides y los fitoestanoles contribuyen a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo.	Para que un producto pueda llevar esta declaración se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria mínima de 0,8 g de fitoesteroides o fitoestanoles.

<sup>1</sup>: Reglamento nº 2009/983/CE, <sup>2</sup>: Reglamento nº 2012/432/CE.

A su vez, existe un informe del Comité científico de la alimentación humana en el que se hace referencia a la necesidad de limitar la ingesta de fitoesteroles. Dicho informe indica que no existen pruebas que demuestren que un consumo superior de EV de 3 g/día produzca beneficios adicionales y que, puesto que una ingesta elevada puede producir una disminución de la absorción de carotenos, sería prudente evitar las ingestas de EV superiores a dicha cantidad (Decisión de la Comisión 2004/336/CE).

El etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitoesteroles, ésteres de fitoesterol, fitoestanoles y ésteres de fitoestanoles añadidos se regula en el Reglamento nº 2004/608/CE, donde se indica la denominación exacta que deben presentar estos compuestos (“esterol vegetal”, “éster de esteroles vegetal”, “estanol vegetal” o “éster de estanoles vegetal”) y que, en el mismo campo de visión que el nombre con el que se comercializa el producto, se deberá indicar que dicho alimento se dispensa “con esteroides/estanoles vegetales añadidos”. Paralelamente se contempla que en los productos enriquecidos con EV se debe advertir que el producto debe consumirse como parte de una dieta equilibrada y variada que incluya el consumo regular de frutas y hortalizas para ayudar a mantener los niveles de carotenoides.

Los EV que se utilizan en la suplementación de alimentos pueden proceder de distintas fuentes, como el *tall oil* (subproducto de la fabricación de papel, procedente de la pasta de madera de coníferas, como el pino) y/o de distintos tipos de aceites vegetales comestibles (soja, girasol, maíz, colza, entre otros). A su vez y, dependiendo de la naturaleza físicoquímica del alimento, los ingredientes fuente de EV pueden



presentarse en distintas formas físicas (en polvo, microencapsulados, emulsionados, esterificados...) dependiendo de su procedencia. Se ha evaluado el efecto del almacenamiento sobre suspensiones microcristalinas de EV presentes en aceite de colza, grasa de leche, aceite de coco y aceite de palma, sin determinar el contenido individual de estos compuestos (Soupas et al., 2006). Posteriormente, se han indicado los contenidos individuales de diferentes ingredientes fuente de EV (Clifton et al., 2008, González-Larena et al., 2011) (**cuadro n° 5**). En estos estudios se observa que dependiendo del origen, la proporción entre los EV varía.

Por otro lado, en un estudio en el que se evalúa el contenido de EV de subproductos obtenidos a partir del refinado de grasas comestibles de diferente origen (sin especificar) y utilizados como ingredientes para piensos, se ha determinado que los contenidos de EV (g/100g) oscilan entre: 0,03 y 2,02 g de  $\beta$ -sitosterol, no detectado – 0,71 g de campesterol, no detectado – 0,48 g de estigmasterol y no detectado – 0,35 g de brasicasterol (Ubhayasekera and Dutta, 2009).

Cuadro nº 5. Contenido individual y total de esteroides vegetales (g/100 g de ingrediente) en ingredientes fuente de esteroides vegetales.

Origen	$\beta$ -Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	Brasicasterol	Sitostanol	Campestanol	Totales
Soja <sup>1</sup>	46,1	26,6	19,8	2,4	0,8	0,6	96,30
Soja <sup>a2</sup>	8,99 ± 0,92	5,91 ± 0,56	6,61 ± 0,62	0,23 ± 0,02	0,32 ± 0,12	0,15 ± 0,01	22,37
Soja <sup>b2</sup>	29,95 ± 0,67	17,02 ± 0,37	17,86 ± 0,36	0,58 ± 0,01	1,63 ± 0,03	0,51 ± 0,01	68,02
Tall oil <sup>c1</sup>	77,9	9,5	0,9	0,1	8,3	1,0	97,70
Tall oil <sup>2</sup>	15,97 ± 1,75	1,88 ± 0,20	0,16 ± 0,01	0,01 ± 0,00	2,84 ± 0,46	0,26 ± 0,04	20,94
Tall oil <sup>c2</sup>	55,94 ± 3,66	5,06 ± 0,33	0,58 ± 0,05	0,03 ± 0,00	8,48 ± 0,58	0,85 ± 0,07	70,93
Tall oil/colza <sup>a1</sup>	63,5	23,1	0,7	4,4	4,4	0,6	96,70
Mezcla <sup>*c2</sup>	31,17 ± 4,73	7,71 ± 1,00	0,61 ± 0,04	1,08 ± 0,13	3,97 ± 0,54	0,40 ± 0,05	44,93
Mezcla <sup>*2</sup>	63,51 ± 1,63	10,87 ± 0,18	0,93 ± 0,02	1,73 ± 0,03	8,47 ± 0,18	0,90 ± 0,02	86,40
Girasol + tall oil <sup>2</sup>	10,42 ± 1,95	0,95 ± 0,13	0,11 ± 0,01	nd	1,43 ± 1,15	0,15 ± 0,02	13,06
Girasol + tall oil <sup>2</sup>	25,40 ± 1,61	2,34 ± 0,11	0,27 ± 0,01	0,01 ± 0,00	3,66 ± 0,21	0,37 ± 0,02	32,05

\*: a base de aceite de soja, colza, girasol y maíz. <sup>a, b</sup>: contienen estigmasterol (0,17 ± 0,02 y 0,47 ± 0,01 g/100 g de ingrediente, respectivamente). <sup>c</sup>: esteroides vegetales esterificados, <sup>1</sup>: Clifton et al., 2008, <sup>2</sup>: González-Larena et al., 2011. nd: no detectable.

### *1.6 Biodisponibilidad (solubilidad, absorción, metabolismo)*

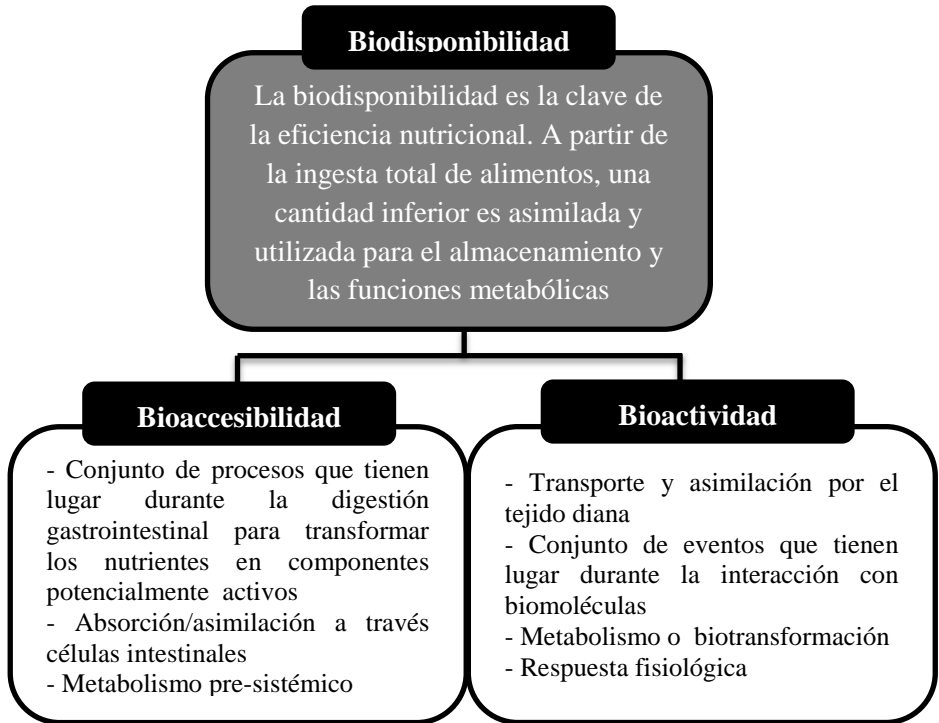
La biodisponibilidad (BD) es un concepto clave para evaluar la eficiencia nutricional de alimentos formulados con el objetivo de mejorar la salud humana independientemente del tipo de alimento considerado, ya que sólo cierta cantidad de nutrientes y/o compuestos bioactivos podrán ser utilizados de forma efectiva por el organismo. El significado del término biodisponibilidad, depende del área de trabajo que se considere. Desde un punto de vista nutricional indica la eficacia con la que los nutrientes son utilizados en las funciones fisiológicas correspondientes o para ser almacenados, sin embargo, en el ámbito farmacológico puede definirse como la velocidad y el grado en que una molécula terapéutica es absorbida y se encuentra disponible en el lugar de acción (Fairweather-Tait, 1992). La BD depende de los procesos de digestión de los alimentos, absorción de los nutrientes y disponibilidad de los mismos para las funciones metabólicas.

El término BD, por tanto, incluye la disponibilidad del compuesto y/o analito para ser absorbido, la solubilidad, la absorción, el metabolismo, la distribución a tejidos y la bioactividad de los compuestos y/o analitos previamente absorbidos. Sin embargo, debido a dificultades prácticas y éticas, la medida de la liberación y bioactividad de compuestos específicos de los alimentos en órganos diana a veces no es posible. Por ello, también, se define la BD como la fracción de una dosis oral de un metabolito bioactivo que alcanza el sistema circulatorio, definición que obvia la bioactividad y se asemeja a la definición de bioaccesibilidad (Schümann et al., 1994).

La *bioaccesibilidad* se define como la fracción de un compuesto que se libera de la matriz en la que se encuentra presente en el tracto gastrointestinal y se encuentra disponible para su absorción intestinal para ser incorporado al torrente sanguíneo (Benito and Miller, 1998). Esta definición incluye todos los procesos que tienen lugar durante la digestión del alimento, absorción/asimilación de las células epiteliales y el metabolismo presistémico. Por su parte, el concepto de *bioactividad* incluye todos los procesos por los que el compuesto/analito bioactivo es transportado y alcanza el tejido diana, como interacciona con otras moléculas, el metabolismo y biotransformación que puede sufrir, la generación de un marcador biológico y la respuesta fisiológica que causa (Fernández-García et al., 2009) (**figura n° 5**).

En la BD influyen dos tipos de factores: intrínsecos al organismo (fisiológicos) y extrínsecos al mismo (dietéticos), pudiendo modificarse la misma dependiendo de las interacciones (sinérgicas o antagónicas) que se produzcan entre ambos factores (Fairweather-Tait, 1996). Entre los factores fisiológicos destacan la edad y el estatus nutricional o fisiopatológico, la microbiota intestinal, y de una forma muy especial, la capacidad individual de adaptación a aportes variados de nutrientes, susceptible de influir en su disponibilidad para su posterior absorción y metabolismo. Entre los factores extrínsecos se encuentran el aporte total por la dieta, la forma química en la que se encuentre el analito así como la solubilidad e interacción con otros componentes del alimento o la dieta (Barberá and Farré, 1992).

Figura nº 5. Definición de biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad (Fernández-García et al., 2009).



### 1.6.1 Evaluación de la biodisponibilidad

Los métodos utilizados en los estudios de BD pueden clasificarse en dos grandes grupos: *in vivo* e *in vitro* (Barberá and Farré, 1992, Van Campen and Glahn, 1999).

*Métodos in vivo*

Los métodos *in vivo* evalúan la BD de un componente de un alimento mediante la administración del mismo a un organismo vivo. En el organismo humano existen factores fisiológicos difícilmente reproducibles en el laboratorio, lo cual sitúa a los métodos *in vivo* como aquellos que proporcionan la mejor estimación de la BD de micronutrientes a partir de alimentos (Van Campen and Glahn, 1999). Entre estos métodos cabe destacar el balance químico, el empleo de isótopos, tanto radioactivos como estables, así como los ensayos con animales, aunque en estos últimos el principal inconveniente radica en la imposibilidad de que la extrapolación al hombre de los resultados obtenidos sea completa, debido a las diferencias entre los metabolismos animal y humano (Wienk et al., 1999).

En el caso de los EV, la evaluación *in vivo* de la BD y su distribución en humanos se ha llevado a cabo de forma directa midiendo la concentración de EV y/o metabolitos conocidos en plasma, heces y/o bilis tras la ingesta de una dieta líquida administrada mediante perfusión intestinal conteniendo EV (Heinemann et al., 1993) o de alimentos enriquecidos (margarinas (Wetstrate et al., 1999, Miettinen et al., 2000, Husche et al., 2011) o bebidas modelo (Lutjohann et al., 1995)) con una cantidad conocida de EV (0,5 - 8,6 g/día). No obstante, debe tenerse en cuenta que en algunos casos, los EV presentes en los alimentos se encuentran en forma de ésteres, glucósidos, entre otras formas químicas, que no son absorbidos en su forma nativa y, antes de su absorción, deben ser hidrolizados por las enzimas intestinales o la microbiota colónica. Como consecuencia, las formas que alcanzan la sangre y los tejidos son

diferentes de las originales presentes en los alimentos y resulta difícil la identificación de todos los metabolitos formados (Day and Williamson, 2001).

Diversos estudios muestran que mientras la absorción del colesterol en humanos varía del 30 al 60% (Heinemann et al., 1993, Lutjohann et al., 1995), la absorción de EV es menor y diferente dependiendo del fitoesterol/fitoestanol considerado. Los niveles de absorción para el campesterol (9,4-14,8%) son aproximadamente 3 veces superiores a los del  $\beta$ -sitosterol (3,1-4,5%) y estigmasterol (~ 4%). La absorción del campestanol y sitostanol es menor (Heinemann et al., 1993, Miettinen et al., 2000), sugiriendo que la presencia de la insaturación entre el C5 y C6 parece incrementar el grado de absorción, mientras que un aumento en la longitud de la cadena lateral provoca una disminución de la absorción (Heinemann et al., 1993, Ostlund et al., 2002).

En suero de sujetos sanos, se han determinado que las concentraciones de EV son siempre inferiores a 1 mg/dL (Miettinen et al., 2000, Amundsen et al., 2004, Korpela et al., 2006, Carpe-Berdiel et al., 2009). No obstante, las concentraciones observadas en pacientes con sitosterolemia (mutación genética de los transportadores de excreción ABCG5/8, que provoca trastornos metabólicos y acumulación de compuestos lipídicos en diferentes partes del organismo) es superior, entre 12 y 47 mg/dL (Salen et al., 1992, Plat et al., 2001, Sudhop and von Bergmann, 2004).

En ratas, ratones o hámsters, se ha evaluado la distribución de los EV y sus productos de degradación en linfa (Grandgirard et al., 1999), plasma, y tejidos (hígado, intestino, aorta, cerebro) (Bhattacharyya, 1981, Ntanios

and Jones, 1998, Sanders et al., 2000, Tomoyori et al., 2004, Batta et al., 2005, Liang et al., 2011), así como en plasma de primates no humanos (Bhattacharyya and Eggen, 1981). Estos estudios muestran diferentes grados de absorción según el EV considerado, siendo, en general: campesterol >  $\beta$ -sitosterol  $\approx$  estigmasterol, al igual como sucede en humanos.

#### *Métodos in vitro*

Como alternativa a los estudios *in vivo*, se han desarrollado sistemas *in vitro* que simulan las condiciones fisiológicas y pueden resultar predictivos de la situación *in vivo*. Características como su rapidez, relativo bajo coste, sencillez y mejor control de las variables experimentales, han propiciado su creciente utilización para evaluar la BD de distintos componentes de los alimentos (Ekmekcioglu, 2002).

Mediante estudios *in vitro* se pueden simular las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, tiempo de incubación) del tracto gastrointestinal, y evaluar las posibles transformaciones de los compuestos inicialmente presentes en el alimento, así como las interacciones entre los distintos componentes del alimento que puedan acontecer durante su tránsito intestinal. Sin embargo, estos métodos proporcionan estimaciones relativas y no absolutas de la BD, puesto que no tienen en cuenta determinados factores fisiológicos intrínsecos del organismo (estado nutricional, secreción gastrointestinal, flora intestinal, transporte activo, interacciones con la mucosa, cinética del tránsito intestinal, etc.) (Van Campen and Glahn, 1999, Wienk et al., 1999).



### *Solubilidad y diálisis*

Estos métodos se basan, generalmente, en la simulación del proceso de digestión gastrointestinal humano. Consisten en un tratamiento secuencial enzimático en varias etapas, salival con  $\alpha$ -amilasa a pH 6,3-6,7 y/o gástrica con pepsina a pH 1,1-2,5, e intestinal con pancreatina y sales biliares a pH 7,8-8,0 (Granado et al., 2007, McClements and Li, 2010, Hur et al., 2011), y posterior estimación de la fracción del componente estudiado soluble (fracción bioaccesible) o dializable a través de una membrana de determinado tamaño de poro.

- Métodos basados en la solubilidad: El primer paso para determinar la BD *in vitro* es evaluar la solubilidad de los compuestos objeto de estudio tras la digestión, ya que es la fracción soluble o bioaccesible (FB) la que es transportada para su absorción en los enterocitos. La FB se define como la cantidad de un constituyente de un alimento que está presente en el intestino como consecuencia de su liberación de la matriz alimentaria, y que podría ser potencialmente absorbida (Saura-Calixto et al., 2007). Se estima analizando la cantidad de componente soluble en el sobrenadante obtenido por centrifugación (Crews et al., 1983) o filtración (Narasinga and Prabhavathi, 1978). De este modo, se estima la fracción máxima de componente ingerido, teóricamente disponible para su absorción (Versantvoort et al., 2005).

- Métodos basados en la diálisis: Incorporan una membrana de diálisis durante el proceso de digestión intestinal para simular una difusión pasiva a través del epitelio intestinal. El proceso de diálisis puede llevarse a cabo en equilibrio (Miller et al., 1981) o en continuo (Minihane et al., 1998). Estos métodos sólo proporcionan información relativa a la fracción

del componente soluble que se halla potencialmente disponible para la absorción que tiene un tamaño inferior al de poro de la membrana de diálisis utilizada.

Los métodos de estudio de la bioaccesibilidad *in vitro* únicamente miden la primera etapa en el proceso de BD, es decir, la solubilidad del compuesto objeto de estudio, requisito previo y necesario para su posterior absorción. A pesar de esta limitación, los estudios de bioaccesibilidad proporcionan datos útiles que permiten establecer comparaciones entre los distintos alimentos y determinar el efecto causado por diferentes factores sobre la BD de los componentes de los alimentos.

Se ha evaluado la distinta afinidad (solubilidad) que presentan los EV por micelas mixtas, sintetizadas artificialmente, a partir de una matriz lipídica y/o gliocodeoxicolato, taurodeoxicolato o taurocolato sódico. A partir de estos estudios, se observa que el colesterol es el esteroles más soluble en las micelas, seguido del  $\beta$ -sitosterol y campesterol, siendo el estigmasterol el menos soluble. En cuanto a la afinidad por la fase acuosa, mientras el colesterol sigue siendo el esteroles más soluble en este tipo de fase, en el caso de los EV, el campesterol presenta mayor afinidad que el  $\beta$ -sitosterol/sitostanol, indicando que la estructura juega un papel importante en la solubilidad y transferencia de estos compuestos de la micela a la fase acuosa para ser absorbidos (Armstrong and Carey, 1987, Hamada, et al., 2006, Matsuoka et al., 2008, Matsuoka et al., 2010, Goncalves et al., 2011).

En estudios que incluyen una digestión gastrointestinal, Malaki Nik et al. (2011) evalúan la liberación y transferencia del  $\beta$ -sitosterol a la fase acuosa, tras un proceso de digestión sobre emulsiones modelo (a partir de

aceite de soja y proteína de soja). El proceso de digestión incluye el uso de pepsina, pancreatina, colipasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>, extracto biliar y fosfolípidos. Estos autores observan que, en ausencia de lipólisis (sin lipasa pancreática), la transferencia esta principalmente determinada por la estructura molecular, sin embargo, la presencia de dicha lipasa aumenta la velocidad de transferencia a la fase acuosa.

### *1.6.2 Cultivos celulares*

La solubilidad es un prerrequisito para la absorción de un componente de un alimento, pero no toda la fracción soluble del mismo es absorbida. En un intento de aproximarse a las condiciones *in vivo*, desde hace varios años se ha introducido, en los sistemas *in vitro*, los cultivos celulares. La utilización de métodos que simulan el proceso de digestión humano en combinación con cultivos celulares, permite evaluar los procesos de captación y transporte en el epitelio intestinal a partir de la fracción bioaccesible obtenida del alimento (Ekmekcioglu, 2002). La línea celular más utilizada, son las células Caco-2, modelo validado de epitelio intestinal.

La línea celular Caco-2 fue establecida en 1977 por Fogh y colaboradores a partir de un adenocarcinoma de colon humano, moderadamente bien diferenciado, obtenido de un paciente de 72 años de raza caucasiana. Estas células crecen en cultivo adheridas a un sustrato formando monocapa. Cuando alcanzan la confluencia se diferencian espontáneamente para dar lugar a una monocapa polarizada que presenta muchas de las características funcionales y morfológicas de los enterocitos

humanos maduros: organización de las células dentro de una monocapa polarizada, formación de domas, uniones intercelulares estrechas, microvellosidades en el lado apical y enzimas de secreción propias de la membrana del borde en cepillo como fosfatasa alcalina, sacarasa-isomaltasa, lactasa, etc (Pinto et al., 1983).

Con disoluciones patrón, se ha evaluado la captación de células intestinales (Caco-2) expuestas a diferentes concentraciones de EV (0-500  $\mu$ M), en presencia o ausencia de micelas sintetizadas a partir de taurocolato sódico y ácido oleico observando diferente grado de absorción en función de la estructura del compuesto, siendo, en general, la captación: campesterol >  $\beta$ -sitosterol ~ estigmasterol (Fahy et al., 2004, Palmgrén et al., 2005, Ito et al., 2012).

En zumo de naranja suplementado con comprimidos multivitamínicos conteniendo EV o con EV en polvo, Bohn et al. (2007), investigan el efecto de diferentes formulaciones enriquecidas en EV (sin contenido lipídico) en la incorporación del colesterol en micelas mixtas tras una digestión gastrointestinal simulada (llevada a cabo con pepsina y pancreatina-extractos biliares). Posteriormente, se realiza la evaluación de la acumulación del colesterol micelar en células Caco-2 para determinar en qué etapa(s) los EV disminuyen la transferencia del colesterol desde la matriz alimentaria a las células epiteliales. Estos autores muestran que el zumo de naranja enriquecido con EV disminuye la micelarización del colesterol, si bien no se evalúa la solubilidad de EV en las micelas mixtas y la fase acuosa tras la digestión gastrointestinal.

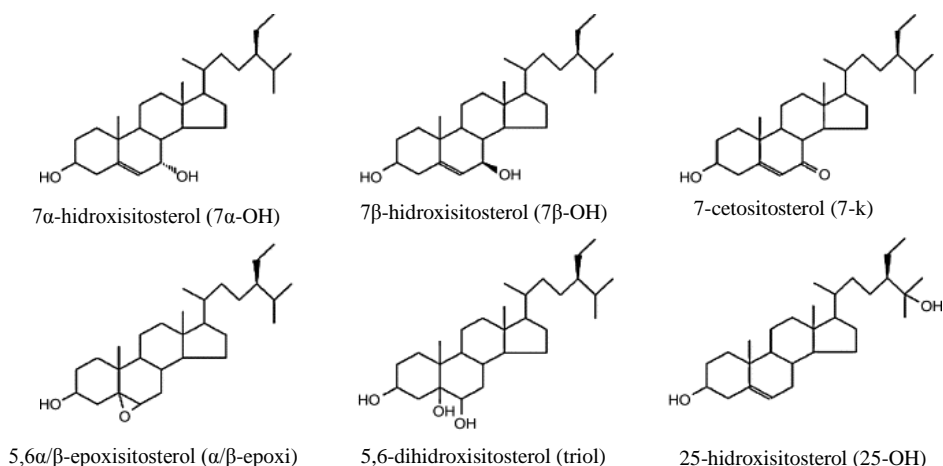
## 2. Óxidos de esteroides vegetales

### 2.1 Formación

En general los esteroides presentan insaturaciones en su estructura y, por lo tanto, son susceptibles de ser oxidados mediante un mecanismo de radicales libres, que puede iniciarse por diversos factores, tales como: los tratamientos por calor, la incidencia de luz, la presencia de aire, agua y/o de metales de transición (Ryan et al., 2009), obteniéndose productos de oxidación del colesterol (COPs) y de los esteroides vegetales (POPs), que en conjunto se denominan productos de oxidación de esteroides (SOPs). La nomenclatura sistemática de estos compuestos se muestra en el **Anexo 1**.

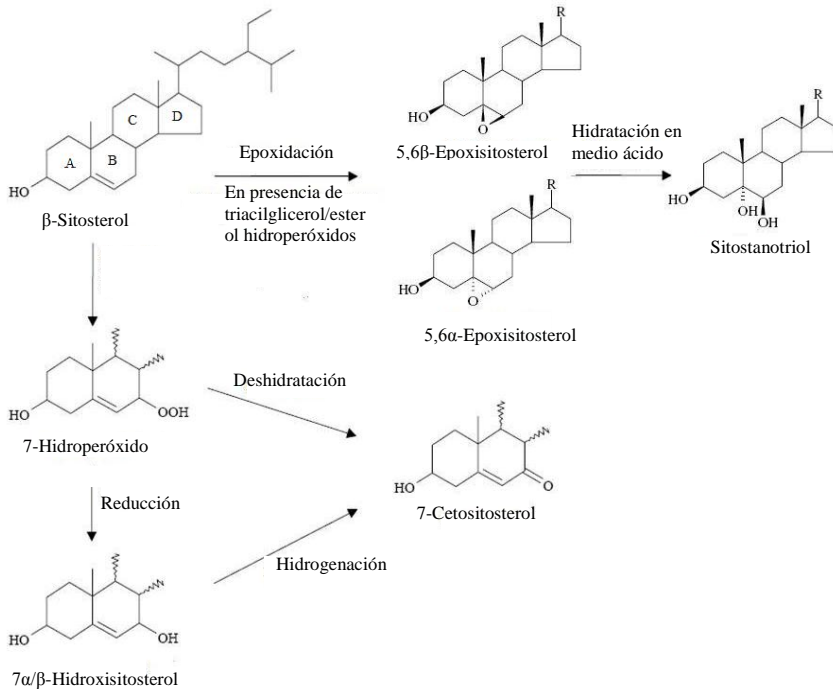
A modo de ejemplo, en la **figura n° 6** se muestran las principales estructuras de los productos de oxidación del  $\beta$ -sitosterol.

Figura n° 6. Productos de oxidación mayoritarios del  $\beta$ -sitosterol (adaptación de Lea et al., 2004).



La oxidación de los fitosteroles puede realizarse vía enzimática (por acción de monooxigenasas, deshidrogenasas, hidroxilasas...) o no enzimática, y en este último caso, puede producirse una autooxidación (mecanismo radicalario) o bien, una fotooxidación (mecanismo no radicalario) por la incidencia de la luz solar, la luz UV artificial o la irradiación (Ryan et al., 2009). Esta oxidación se produce mayoritariamente en el anillo B del núcleo central de la molécula esteroidea. En la **figura n° 7** se muestra, a modo de ejemplo, el mecanismo radicalario de oxidación del  $\beta$ -sitosterol.

Figura n° 7. Mecanismo radicalario de oxidación del  $\beta$ -sitosterol (adaptación de Soupas et al., 2004).



La primera reacción de autooxidación da lugar a la formación del 7-hidroperóxido; durante el calentamiento o almacenamiento, los 7-hidroperóxidos pueden descomponerse, produciendo epímeros  $7\alpha/\beta$ -hidroxiesteroles ( $7\alpha/\beta$ -OH) y, a partir de estos, los 7-cetoesteroles (7-k). Los epímeros  $\alpha/\beta$ -epoxiesteroles se forman por la reacción entre los 7-hidroperóxidos y el esteroles no oxidado. A partir de los epoxiesteroles, por hidratación en medio ácido, se generan los trioles (**figura nº 7**).

El mecanismo de generación de productos de oxidación en la cadena alquílica ha sido descrito para el colesterol, pero en el caso de los EV se conoce menos (Ryan et al., 2009). La oxidación de la cadena lateral de los EV para dar los correspondientes derivados oxidados (25-hidroxi, 27-hidroxi, entre otros) se produce por un mecanismo enzimático (Hovenkamp et al., 2008), sin embargo la oxidación en esta parte de la molécula es mucho menor que en el caso del anillo esteroideo (Smith, 1992).

Además de los productos de oxidación mayoritarios (hidroxi-, ceto-, triol y epoxi-derivados), se ha indicado que tras la exposición de los EV a altas temperaturas y/o tiempos prolongados, se promueve la formación de compuestos secundarios, como dímeros, trímeros, tetrámeros, compuestos volátiles y moléculas de fragmentación de los EV (Rudzinska et al., 2009).

#### *Factores que afectan la formación de POPs en los alimentos*

El contenido y distribución de los POPs en los alimentos dependen de numerosos factores:

- Cantidad inicial de esteroides vegetales: Se ha constatado que patatas, fritas en aceite de palma tienen una menor cantidad de POPs (5  $\mu\text{g/g}$

lípidos) frente a patatas fritas en aceite de girasol y girasol alto oleico (46-35  $\mu\text{g/g}$  lípidos). Hecho que atribuyen al contenido de fitoesteroles iniciales (ver **cuadro nº 1**) (Dutta and Appelqvist, 1997).

▪ Temperatura y tiempo: Se ha demostrado que al aumentar la temperatura del procesado, se forman una mayor cantidad de POPs (Soupas et al., 2007). Del mismo modo, un incremento en el tiempo de fritura aumenta la proporción de óxidos totales formados. Este hecho ha sido puesto de manifiesto en estudios con aceites vegetales sometidos a altas temperaturas (Dutta, 1997, Lampi et al., 2002, Bortolomeazzi et al., 2003, Zhang et al., 2005).

▪ Estructura de los esteroides iniciales: Se ha demostrado que los fitoestanoles (saturados) presentan menos reactividad frente a los fitoesteroides (insaturados) y, en consecuencia, mayor estabilidad frente a la oxidación (Soupas et al., 2007).

▪ Esterificación: Se ha constatado que a bajas temperaturas ( $\leq 100^\circ\text{C}$ ) y tiempos superiores a 24h, los EV libres se oxidan en menor proporción. Sin embargo, a temperaturas superiores ( $180^\circ\text{C}$ ), la formación de productos de oxidación secundarios es similar para los EV libres y esterificados (Soupas et al., 2005). De modo similar, Yanishlieva et al. (1980), demuestran que los ésteres se oxidan más fácilmente que los EV libres, pero al aumentar la temperatura la diferencia es menos acusada.

▪ Grado de saturación de la matriz alimentaria: La proporción de productos de oxidación aumenta al aumentar el grado de saturación de la matriz lipídica empleada, puesto que cuanto más insaturada es la matriz, ésta previene la oxidación de los fitoesteroides oxidándose ella misma (Soupas et al., 2004, Soupas et al., 2007).



▪ Presencia de agua en la matriz alimentaria: La oxidación de fitoesteroles es más rápida en una emulsión que en un aceite puro. La medida de la tensión interfacial muestra que los fitoesteroles presentan un alto grado de actividad superficial, la cual les permite migrar a la interfase de la emulsión aceite-agua donde el estrés oxidativo es mayor (Cercaci et al., 2007).

▪ Presencia de antioxidantes: Se ha demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol, las catequinas del té verde y la quercitina protegen a los esteroides de su oxidación (efecto similar al grado de saturación de la matriz) (Xu et al., 2009).

▪ Procesado y almacenamiento: Los procesos tecnológicos, como por ejemplo el prensado y el refinado, favorecen la generación de POPs. En la etapa de desodorización del proceso de refinado se emplean elevadas temperaturas (180-250°C) (OMS FAO, 1994), al igual que en la separación de la fracción de esteroides del destilado obtenido (150-240°C) (Sumner et al., 1995), condiciones favorables para la formación de POPs. Por otro lado, en un estudio de nuestro grupo sobre la evolución del contenido de POPs en papillas destinadas a la alimentación infantil, se puso de manifiesto una mayor influencia del procesado que del almacenamiento (García-Llatas et al., 2008).

▪ Incidencia de la luz: Durante el almacenamiento de los aceites, Zhang et al. (2006) estudian el efecto de la luz solar, luz artificial y radiación con electrones en la formación de POPs, obteniendo una mayor oxidación en los aceites expuestos a la luz solar.

## 2.2 *Efectos biológicos*

La presencia de POPs en plasma se atribuye a: 1) la transformación de los esteroides *in vivo*, en células y tejidos, mediante reacciones de oxidación no enzimáticas, por autooxidación o por procesos enzimáticos (citocromo P450), 2) la oxidación *in vivo* de productos cosméticos aplicados sobre la piel y 3) el aporte exógeno, es decir, la absorción de los POPs de la dieta (Otaegui-Arrazola et al., 2010). Recientemente, se ha indicado que dada la baja absorción de estos compuestos, la síntesis de estos compuestos tiene lugar, principalmente, *in vivo* (Vanmierlo et al., 2012). Sin embargo, una vez absorbidos e integrados en la circulación sistémica, siguen la misma ruta metabólica independientemente de su procedencia.

Los efectos biológicos de los COPs han sido ampliamente revisados, considerándose potencialmente involucrados en la iniciación y progresión de enfermedades crónicas, tales como aterosclerosis, procesos neurodegenerativos o diabetes y otras como el fallo renal (Sottero et al., 2009). Además, se ha descrito que algunos COPs pueden ser citotóxicos, mutagénicos, apoptóticos, proinflamatorios, carcinogénicos, moduladores de receptores de estrógenos, del metabolismo del colesterol/lípido y/o de la función estructural del colesterol en las membranas (Sottero et al., 2009, Vejux and Lizard, 2009, Otaegui-Arrazola et al., 2010). Sin embargo, los estudios sobre los efectos biológicos de los POPs son escasos, poco claros y, muchas veces, contradictorios (Hovenkamp et al., 2008, Ryan et al., 2009, García-Llatas and Rodríguez-Estrada, 2011). A pesar de la escasez de estudios y, debido a la similitud estructural entre el colesterol y los EV,

se considera que los POPs poseen características biológicas análogas a las de los COPs, atribuyéndoles diferentes efectos biológicos que se detallan a continuación.

### *Citotoxicidad*

Se han descrito patrones similares de citotoxicidad para los COPs y los POPs siendo el efecto menos severo para los últimos, es decir, requiriéndose mayores dosis de POPs para obtener un efecto citotóxico similar a los derivados del colesterol.

En macrófagos de ratón (C57BL/6) expuestos a una mezcla de POPs (500  $\mu$ M, 0-120h) de derivados del  $\beta$ -sitosterol y campesterol (50:40) se ha constatado una disminución del crecimiento celular, menos acusada frente a sus análogos COPs (Adcox et al., 2001). Los efectos potencialmente citotóxicos de una mezcla de óxidos de  $\beta$ -sitosterol (30-120  $\mu$ M) y el  $\alpha$ -epoxisitosterol (60  $\mu$ M) se han evaluado (y comparado frente a sus análogos derivados del colesterol) en células monocíticas humanas (U937) mostrando, en primer lugar, que el efecto causado por la mezcla de POPs es diferente al determinado en el caso de los óxidos individuales y, en segundo lugar que, los efectos de los COPs son más severos que los de los POPs, indicando que se requieren menores dosis de COPs para observar un efecto equivalente al causado por los POPs (Maguire et al., 2003). En este mismo tipo de células, se ha corroborado que se requiere una mayor concentración de 7 $\beta$ -hidroxi, triol,  $\alpha/\beta$ -epoxi (6/1) y 7-cetositosterol (30-120  $\mu$ M) para disminuir la viabilidad celular en un grado similar a los correspondientes COPs. Por otro lado, solamente el 7 $\beta$ -hidroxi y el 7-cetositosterol generan un incremento de los núcleos

apoptóticos (60  $\mu\text{M}$ ) (Ryan et al., 2005). Sin embargo, en el caso de los óxidos de estigmasterol ( $\alpha$ -epoxi,  $\beta$ -epoxi, 7-ceto, 7 $\beta$ -hidroxi, epoxidiol, diepoxi y triol) (30-120  $\mu\text{M}$ ), solamente se observa disminución de la viabilidad en los cultivos de monocitos (U937) incubados con diepóxido, epoxidiol, 7 $\beta$ -hidroxi y triol, observándose inducción de apoptosis únicamente en el caso del 7 $\beta$ -hidroxi y epoxidiol mediante un mecanismo caspasa-dependiente (O'Callaghan et al., 2010). Otros estudios han indicado que, en general, el 7 $\beta$ -hidroxi, triol y 7-cetodihidrobrasicasterol, inducen una disminución en la viabilidad celular de monocitos (U937) y células del hepatoma humano (HepG2) (60-120  $\mu\text{M}$ ), siendo el triol el que genera mayor citotoxicidad, incluso a 30  $\mu\text{M}$  (Kenny et al., 2012, O'Callaghan et al., 2012). Sin embargo, Kenny et al. (2012) observan un incremento en la fragmentación y condensación nuclear en los cultivos (U937) expuestos a 7 $\beta$ -hidroxi y 7-cetodihidrobrasicasterol (60-120  $\mu\text{M}$ ), mientras que O'Callaghan et al. (2012) observa también inducción de apoptosis mediada por el triol. En estos mismos cultivos celulares (U937, HepG2), se ha evaluado el efecto citotóxico de los óxidos de campesterol ( $\alpha$ -epoxi,  $\beta$ -epoxi, 7-ceto, 7 $\beta$ -hidroxi o triol) (30-120  $\mu\text{M}$ ), indicando que los monocitos son más sensibles a éstos óxidos que a los de brasicasterol, siendo el triol, el 7 $\beta$ -hidroxi y el 7-ceto los que tienen un efecto más marcado sobre la viabilidad celular y, el 7 $\beta$ -hidroxi (60-120  $\mu\text{M}$ ) y 7-cetocampesterol (120  $\mu\text{M}$ ) los que inducen apoptosis. En cambio, en las células HepG2 la diferencia entre la citotoxicidad de los POPs procedentes de campesterol o brasicasterol es menos marcada, siendo el triol y el 7-cetoderivado los que mayor reducción de la viabilidad producen (O'Callaghan et al., 2012).

En esta misma línea celular, el 7-ceto, 7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi y una mezcla de POPs de  $\beta$ -sitosterol (30-120  $\mu$ M), presentan, en general, un efecto dosis-dependiente en la disminución de la viabilidad celular, observándose efecto apoptótico únicamente en el caso del 7-cetositosterol. Sin embargo, estos autores no observan conexión entre el estrés oxidativo y los compuestos estudiados (Koschutnig et al., 2009). Contrariamente, Ryan et al. (2005) determinan que el 7 $\beta$ -hidroxi y el 7-cetositosterol son los más tóxicos para esta línea celular, sin promover apoptosis.

En células del epitelio intestinal (Caco-2) a concentración de 60  $\mu$ M, el 7 $\beta$ -hidroxi y el 7-cetositosterol son los más citotóxicos (Ryan et al., 2005). Se ha investigado el mecanismo antiproliferativo/apoptótico inducido por el 7 $\beta$ -hidroxisitosterol (60  $\mu$ M) y el 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (30  $\mu$ M) en este tipo de células, indicando que el 7 $\beta$ -hidroxisitosterol induce una ruta caspasa-dependiente (con disminución del potencial de membrana y liberación del citocromo C) mientras que el 7 $\beta$ -OHcolesterol promueve la muerte celular mediante una vía caspasa independiente (fragmentación del DNA, expresión de la endonucleasa G y la acumulación de especies reactivas de oxígeno) (Roussi et al., 2005, 2007).

En general, estos estudios constatan que los efectos citotóxicos de los POPs son menos severos que en el caso de los COPs y se ha demostrado que el mecanismo antiproliferativo/apoptótico de ambos tipos de compuestos es diferente. Sin embargo, no se ha podido establecer un orden de citotoxicidad en función del SOP considerado puesto que la citotoxicidad inducida depende no solo de la estructura del óxido, sino de la susceptibilidad de la línea celular utilizada y el grado de captación de los compuestos ensayados (Koschutnig et al., 2009). Se ha observado que

los POPs individuales más tóxicos (7 $\beta$ -hidroxi, 7-ceto y triol) producen apoptosis en los cultivos monocíticos (U937), mientras que generan necrosis en los cultivos de adenocarcinoma colónico (Caco-2) y del hepatoma humano (HepG2) (60-120  $\mu$ M) (Ryan et al., 2005).

En estudios *in vivo*, se ha determinado que la mortalidad inducida por los POPs derivados de estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol ( $\alpha$ -,  $\beta$ -epoxi y triol) en *Tenebrio molitor*, es cinco veces inferior a la causada por el derivado de colesterol correspondiente, sin embargo no existen diferencias entre los distintos productos de los EV (Meyer et al., 1998).

#### *Efecto proaterosclerótico*

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico en la pared de las arterias que ocurre en respuesta a una agresión sobre el endotelio. El desarrollo de este proceso tiene lugar fundamentalmente en la capa íntima arterial donde se desarrolla la placa de ateroma. El colesterol LDL se deposita dentro de las placas de ateroma cuando las concentraciones de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son altas. De forma paralela, los productos de oxidación de las lipoproteínas (LDLox), no reconocidos por los receptores LDL, se van depositando en las paredes del sistema vascular y formando moléculas derivadas (oxisteroles, ácidos grasos oxidados...) (Otaegui-Arazola et al., 2010). Las células de la pared arterial interpretan este depósito como una invasión y provocan que el sistema inmune desate el proceso inflamatorio. Los monocitos circulantes se adhieren y penetran en la pared de la arteria, se transforman en macrófagos y comienzan a fagocitar partículas LDL, convirtiéndose en células espumosas que, tras su proliferación, generan la placa de ateroma. Este proceso está

principalmente causado por la hipercolesterolemia y la inflamación (Schroepfer, 2000, Steinberg, 2002).

Se ha descrito que los COPs podrían tener distintos mecanismos de acción en la modulación del proceso aterosclerótico: 1) disfunción de las células del endotelio aumentando su permeabilidad, 2) adhesión y migración de los monocitos (expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y quimiocinas) 3) generación de las células espumosas (diferenciación de monocitos a macrófagos), 4) interacción de macrófagos con las células del músculo liso, 5) inflamación y formación de la capa fibrótica, 6) apoptosis vascular y degradación de matriz extracelular (Poli et al., 2009). Aunque estos efectos han sido descritos para COPs, no se conoce exhaustivamente la influencia de los POPs en el desarrollo de este proceso. Sin embargo, Tomoyori et al. (2004), en un estudio en ratones deficientes en apoenzima E alimentados con una mezcla de POPs procedentes de campesterol y  $\beta$ -sitosterol (0,2 g/Kg dieta, 9 semanas), observan que estos compuestos no promueven el desarrollo de la aterosclerosis no aumentando el colesterol en aorta y suero. Más recientemente, Liang et al. (2011) determinan en hámsters una mayor incidencia sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica de los POPs (0,1% (p/p) de una mezcla de  $7\alpha/\beta$ -hidroxi,  $\alpha/\beta$ -epoxi y 7-cetoderivado de  $\beta$ -sitosterol o estigmasterol) frente a los EV, pero no diferente de los sujetos control.

#### *Efecto genotóxico/mutagénico*

Aunque se ha descrito que algunos COPs pueden tener un efecto mutagénico en ratones (Cheng et al., 2005), no existen resultados

concluyentes sobre la influencia de los POPs en la inducción de efectos genotóxicos. En estudios *in vitro* se ha indicado que, en fibroblastos (V79-4) incubados con una mezcla de POPs de  $\beta$ -sitosterol (30-120  $\mu$ M) (Maguire et al., 2003) y en linfocitos periféricos expuestos a una mezcla (30%) de óxidos de EV ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol) (Lea et al., 2004) no se observan aberraciones cromosómicas sugiriendo la ausencia de potencial genotóxico de estos compuestos. Paralelamente, el potencial efecto mutagénico de estos compuestos individuales ( $7\alpha$ -hidroxi,  $7\beta$ -hidroxi, 7-cetositosterol) (Koschutnig et al., 2010) o mezclas (Lea et al., 2004) se ha evaluado sobre diversas cepas de *Salmonella Typhimurium* constatando la ausencia de mutación bacteriana. En estudios *in vivo*, se ha observado que la administración de trioles (1,9-9,4 mg/kg ratón) o epóxidos (13-67 mg/kg ratón) procedentes de campesterol o  $\beta$ -sitosterol no presenta potencial genotóxico sobre ratones, dada la ausencia de incremento en la frecuencia de eritrocitos micronucleados frente al control (Abramsson-Zetterberg et al., 2007).

#### *Efecto endocrino-reproductivo*

Debido a su estructura, los POPs podrían interferir con la actividad estrogénica. En cultivos celulares de cáncer de útero (HeLa), se ha observado que  $\beta$ -epoxisitosterol, campestanotriol y sitostanotriol pero no  $\alpha$ -epoxisitosterol,  $\alpha$ -epoxicampesterol ni  $\beta$ -epoxicampesterol pueden inducir actividad luciferasa (marcador de la activación de los receptores estrogénicos) en menor medida que los correspondientes COPs (Sato et al., 2004). A su vez, una mezcla de derivados oxidados del estigmasterol ( $7\alpha$ -hidroxi,  $7\beta$ -hidroxi, 7-dehidro y 7-cetoestigmasterol) se han asociado



con modulación *in vitro* de la acción de la hormona sexual femenina 17 $\beta$ -estradiol en células de adenocarcinoma de endometrio humano (Ishikawa) y de mama (MCF-7) (Newill et al., 2007), lo que podría representar su interferencia con hormonas *in vivo*. Contrariamente, en este último tipo de células, se ha observado que la incubación con una mezcla de POPs de estigmasterol promueve una respuesta estrogénica débil mientras que la exposición al 7 $\beta$ -hidroxiestigmasterol induce un efecto antiestrogénico (Muller et al., 2007). En otro estudio (van den Heuvel et al., 2006), se ha demostrado que mezclas de óxidos de  $\beta$ -sitosterol o estigmasterol que contienen principalmente colestan-24-etil-3-ona, 4-colesten-24-etil-3-ona y 4-colesten-24-etil-3,6-diona modulan la actividad androgénica pero no la estrogénica, sin poder confirmar la modulación de la actividad androgénica en peces mosquito (*mosquitofish*). Estos estudios sugieren que dependiendo del POP considerado, del esteroide de origen, y la susceptibilidad celular, el efecto sobre las hormonas sexuales puede variar.

Los estudios *in vivo* realizados hasta el momento, no permiten extraer una conclusión sobre el efecto de los POPs a nivel reproductivo. Se ha observado efecto abortivo en ratones alimentados con elevadas concentraciones de óxidos (que incluyen triol y 7 $\beta$ -hidroxisitosterol de pureza desconocida) (30 mg POPs/kg peso) (Pakrashi and Basak, 1976), mientras que, más recientemente, se ha demostrado el efecto androgénico de los productos de oxidación de  $\beta$ -sitosterol (4-hidroxi, 7-hidroxi, 7-oxositosterol y estigma-7-en-3-ol) los cuales pueden provocar un aumento de esteroides sexuales en plasma, acelerando la espermatogénesis en peces cebra machos y el aumentando la atresia ovárica en hembras (Christianson-Heiska, et al., 2007).

*Efecto inflamatorio*

Recientemente, se ha revisado el efecto proinflamatorio de los COPs tanto *in vitro* como *in vivo* (Leonarduzzi et al., 2012), mostrando que estos compuestos están relacionados con la modulación de la expresión y/o producción de diversos biomarcadores inflamatorios. Sin embargo, los estudios relacionados con el potencial inflamatorio de los POPs son limitados (Hovenkamp et al., 2008). Solamente un estudio *in vitro* evalúa el efecto sobre la producción de IL-8 y MCP-1 en células monocíticas (U937) expuestas a 7 $\beta$ -hidroxi y 7-cetositosterol (50  $\mu$ M) (Vejux et al., 2012), no observándose un efecto proinflamatorio. Este hecho es acorde con los resultados obtenidos en el único estudio *in vivo* realizado por Kimura et al. (1995), quienes sugieren que diferentes óxidos de  $\beta$ -sitosterol (4 $\beta$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi, 7-oxositosterol, estigmastano-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, estigmastano-3 $\beta$ ,6 $\beta$ -diol, y estigmastano-4-ene-3 $\beta$ ,6 $\beta$ -diol) inhiben la inflamación producida por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, inductor de inflamación en orejas en ratones. Estos autores constatan que los POPs influyen en el proceso inflamatorio y que la estereoquímica de grupo oxidado en el núcleo central de la molécula esteroidea está relacionada con la inhibición del efecto inflamatorio.

*Modulación de la homeostasis del colesterol*

Se ha demostrado que los COPs podrían influir en el metabolismo del colesterol mediante diversos mecanismos: bloqueo de la proteína de unión de esteroides (SREBP), aceleración de la degradación de la HMGCoA reductasa, estimulación del receptor hepático X (LXR) que regula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo lipídico, entre

ellos, los de la familia de proteínas transportadoras ABC y la estimulación e inhibición del transporte de esteroides (Otaegui-Arrazola et al., 2010).

Estudios *in vitro* relativos a la influencia de los POPs en el metabolismo del colesterol, muestran resultados contradictorios. En células humanas embrionarias renales expuestas a derivados sintéticos del campesterol (22(E)-campesta-5,7,22-trieno-3 $\beta$ ,25-diol) y del estigmasterol (estigma-5-en-25-ol-3-ona) se observa una activación del LXR que produce un incremento de la expresión de los transportadores de excreción ABC (Kaneko et al., 2003). Además, en estudios *in vivo* la administración oral a ratones de un derivado sintético del ergosterol (22(E)-ergost-22-en-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol) induce la expresión (ARNm) de ABCA1, ABCG5 y ABCG8 inhibiendo la absorción intestinal de colesterol. En cuanto a la regulación del LXR por formas naturales de POPs, las evidencias son escasas. En enterocitos y hepatocitos el 7-cetosterol es capaz de inducir la expresión de ABCA1, mientras que el sitostanetriol no presenta efecto alguno (Engel et al., 2005). Sin embargo, basándose en la ausencia de efecto de una mezcla de POPs (7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi, 7-ceto,  $\alpha$ -epoxi y  $\beta$ -epoxi derivados de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol) en la activación de LXR en Caco-2, Plat et al. (2005), especulan que los derivados oxidados en la cadena lateral, pueden estar más involucrados en la modulación del metabolismo del colesterol al igual como sucede en el caso del colesterol, cuyos compuestos derivados de la oxidación del anillo B de la estructura esteroidea no modulan la actividad de LXR, mientras que aquellos derivados oxidados en la cadena lateral, como por ejemplo, 22(R)-hidroxi, 24(S)-hidroxi o 24(S),25-epoxicolesterol, sí que influyen en su activación (Janowski et al., 1996).

La influencia de los POPs en la síntesis del colesterol, es también menor que en el caso de los COPs. Kakis et al. (1977), demuestran que la administración intravenosa del 7-cetocolesterol en ratas inhibe la producción endógena de colesterol (20-30%), mientras que el 7-cetositosterol no presenta efecto alguno. Recientemente, se han evaluado los efectos de los POPs (0,1% (p/p) de una mezcla de 7 $\alpha$ / $\beta$ -OH,  $\alpha$ / $\beta$ -epoxi y 7-cetoderivado de  $\beta$ -sitosterol o estigmasterol) sobre distintos transportadores y enzimas en hámsters, mostrando que, además de un aumento en el peso del hígado, estos óxidos no reducen el contenido de colesterol plasmático. Los EV homólogos inhiben la expresión relativa de ACAT y de la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP, encargada de insertar estos compuestos en los quilomicrones), mientras que los POPs no presentan ningún efecto sobre estas proteínas, pero si disminuyen la expresión de ABCG5, SREBP2 y LDLR (Liang et al., 2011).

#### *Efecto carcinogénico*

Los POPs se han identificado en plantas utilizadas comúnmente en la medicina tradicional china por su actividad antitumoral. Por ejemplo, en *Euphoria fischeriana*, se ha determinado la presencia de 7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi y 7-ceto derivados de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Schroeder et al., 1980). Del mismo modo, se han aislado 7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxisitosterol de la *Urtica dioica* L., una planta utilizada en el tratamiento del adenoma de próstata (Chaurasia and Wichtl, 1987). Sin embargo, queda por determinar si son realmente estos compuestos los responsables de los efectos que se les atribuyen.

En un estudio reciente, se ha indicado la existencia de genes comunes entre el cáncer, el metabolismo lipídico y la inflamación, mostrando que tanto las LDLox como su receptor podrían promover la transformación celular mediante un mecanismo que incluiría la activación del factor nuclear kappa B (NFκB) (Hirsch et al., 2010). Otros autores también han relacionado la oxidación de lipoproteínas con el desarrollo de varios tipos de cáncer (Delimaris et al., 2007, Scoles et al., 2010).

Se han revisado los posibles mecanismos mediante los cuales los COPs podrían inducir su potencial efecto carcinogénico. Estudios tanto *in vitro* (macrófagos, fibroblastos) como *in vivo* (humanos) han indicado una asociación entre diferentes tipos de COPs y el desarrollo y la progresión de cáncer de colon, pulmón, mama y conductos biliares. Estos compuestos podrían incidir en múltiples etapas del proceso, como en la iniciación del tumor incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno (RNS), en la promoción del mismo mediante el estimulación de la expresión de proteínas involucradas en la alteración del fenotipo celular (COX-2) y, finalmente, en la progresión del tumor favoreciendo la migración (Jusakul et al., 2011). Recientemente se ha indicado que los COPs y sus receptores (principalmente LXR) podrían controlar la expresión génica de células inmunes y, por tanto, de procesos patológicos relacionados con la respuesta inmune, incluyendo la formación de tumores y su crecimiento. El estudio del papel de los oxisteroles en el control de funciones celulares se complica por el hecho que estos compuestos pueden actuar de modo independiente a LXR, incidiendo sobre otros receptores. Este hecho, motiva la investigación de estos compuestos como moléculas de señalización posiblemente

implicadas en funciones celulares desconocidas hasta el momento. Sin embargo, la identificación de las funciones celulares influenciadas por los óxidos de esteroides podrían ser claves para el control de enfermedades de base inmunológica y tumoral (Traversari and Russo, 2012).

#### *Efecto liporeductor*

La campest-5-en-3-ona se ha asociado con un efecto liporeductor, sobre la pérdida de peso, de grasa, reducción de triglicéridos y glucosa en sangre en roedores, lo que la hace interesante en el tratamiento de enfermedades coronarias o diabetes (Suzuki et al., 2002, Konno et al., 2005, Ikeda et al., 2006). Resultados similares se han obtenido con el 24-etilcolest-4-en-ona (Suzuki et al., 1998), si bien, estas hipótesis requieren ser estudiadas con mayor detalle.

### *2.3 Contenido de óxidos de esteroides vegetales en alimentos e ingredientes*

La determinación del contenido de POPs en alimentos presenta dificultad analítica debido a la escasez de patrones comerciales de estos compuestos (Conchillo et al., 2005), así como por la existencia de un amplio número de compuestos con estructuras muy similares en concentraciones muy pequeñas en los alimentos (García-Llatas and Rodríguez-Estrada, 2011).

Son muy escasos los datos sobre contenidos. En alimentos no enriquecidos en EV, el mayor número de datos sobre POPs corresponde a matrices con alto contenido lipídico, como aceites, si bien también se han

detectado POPs en café, harina de trigo, productos de repostería o leche y fórmulas infantiles. En el **cuadro n° 6** se muestran los contenidos de POPs en distintos alimentos.

Cuadro n° 6. Contenido de óxidos de esteroides vegetales en alimentos ( $\mu\text{g/g}$  lípidos).

Alimento	Contenido	Alimento	Contenido
Aceites avellana <sup>1</sup>	10,6	Patatas fritas en distintos tipos de aceites <sup>8-9</sup>	
cacahuete <sup>2-3</sup>	2,7 – 9,6	Palma	5 – 41
colza <sup>1,4-6</sup>	1,9 – 102,5	Girasol	40 – 46
girasol <sup>1,2</sup>	4,5 – 67,5	Girasol alto oleico	35 – 46
maíz <sup>2,4</sup>	4,1 – 60,1	Patatas fritas comerciales <sup>10</sup>	1,5 – 21,3
oliva <sup>3-4</sup>	0,1 – 7,7	Productos de repostería <sup>11*</sup>	1,66 – 2,86
oliva virgen lampante <sup>2</sup>	1,5 – 2,5	Preparados infantiles con fruta o miel <sup>12*</sup>	0,64 – 0,70
palma <sup>2</sup>	5,5	Fórmulas lácteas infantiles <sup>13</sup>	0,7 – 5
soja <sup>4</sup>	0,8	Harina <sup>14</sup>	25 – 30
Margarina <sup>7</sup>	13,3	Café <sup>15</sup>	< 0.01

\* contenido referidos a g de producto. 1: Azadmard-Damirchi and Dutta, 2009, 2: Bortolomeazzi et al., 2003, 3: Jonhsson and Dutta, 2006, 4: Zhang et al., 2006, 5: Kmiecik et al., 2009, 6: Lambelet et al., 2003, 7: Conchillo et al., 2005, 8: Dutta and Appelqvist, 1997, 9: Dutta, 1997, 10: Tabee et al., 2008, 11: Cercaci et al., 2006, 12: García-Llata et al., 2008, 13: Zunin et al., 1998, 14: Nourooz-Zadeh and Appelqvist, 1992, 15: Turchetto et al., 1993.

El contenido de POPs en alimentos varía en función de múltiples factores (matriz, procesado, almacenamiento, temperatura...), si bien, en general, los porcentajes de oxidación son relativamente bajos (0,002 – 0,9 % en el alimento), aunque en algunos casos, puede alcanzar valores superiores (3,1%) (Cercaci et al., 2006).

En alimentos enriquecidos en EV se han determinado mayores contenidos de POPs que en las matrices originales: en margarinas 12-68  $\mu\text{g/g}$  producto (Grandgirard et al., 2004a, Conchillo et al., 2005, Johnsson and Dutta, 2006, Husche et al., 2011, Baumgartner et al., 2013), en leche 100  $\mu\text{g/g}$  grasa (Menéndez-Carreño et al., 2008), y en leche en polvo 14  $\mu\text{g/g}$  producto (Soupas et al., 2006). Aunque el aporte mayoritario de POPs en el alimento parece deberse a los aceites utilizados como materia prima en el enriquecimiento, diversos autores sugieren que se necesitan más estudios para elucidar el origen de los POPs en el alimento (Conchillo et al., 2005).

En el **cuadro n° 7** se detalla el contenido individual de los óxidos de  $\beta$ -sitosterol (a) y campesterol (b) determinados en diferentes matrices alimentarias.



Cuadro n° 7a. Contenido individual de óxidos de  $\beta$ -sitosterol en alimentos ( $\mu\text{g/g}$  lípidos).

Aceite	<b>6<math>\beta</math>-OH</b>	<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	<b>7<math>\beta</math>-OH</b>	<b><math>\beta</math>-epoxi</b>	<b><math>\alpha</math>-epoxi</b>	<b>triol</b>	<b>6-k</b>	<b>7-k</b>	<b>diOH</b>
Avellana <sup>1</sup>	0,6-1,7	0,1-0,6	0,1-0,5		0,1-0,9	0,5-1,9		0,8-1,8	
Cacahuete <sup>2-3</sup>		0,3-0,7	0,2-0,5						
Colza <sup>1,4-6</sup>	14,2-27,9	< 0,1-11,2	0,3-20,7	<0,1 -3,0	< 0,1-14,6	1,6		1,4 - 5,1	< 0,1
Girasol <sup>2,5,7</sup>		1,2-14,8	0,8-10,6	<0,1	<0,1-5,3			0,1-34,8	<0,1-4,9
Maíz <sup>2-3</sup>		0,3-15,3	0,3-10,4	0,6	0,5	0,3		0,1-29,6	
Oliva <sup>2-3,5,8</sup>	0,2	<0,1-1,1	<0,1-0,6	<0,1	<0,1	0,4	2,6-3,0	<0,1-1	<0,1
Palma <sup>2,7</sup>		1,3-4,4	1,3		17,2			1,9-17,2	2,9
Soja <sup>5</sup>		0,3	0,5	<0,1	<0,1			<0,1	<0,1
Margarina <sup>9a</sup>		<0,25	3,67	<0,25	<0,25	<0,25		5,93	
Margarina + EV <sup>3,9-11a</sup>		<0,3-6,2	2,5-11,4	<0,3-1,3	5,3	<0,3-1,7		3,9-15,0	
Patatas fritas <sup>7,12-14</sup>		0,2-12,1	0,2-13,0		0,1-110,6 <sup>b</sup>	0,1-10,9		0,2-18,4	0,2-2,8
Repostería <sup>15a</sup>								0,6-1,8	
Fórmulas infantiles <sup>16</sup>								0,5-5,0	
Leche + EV <sup>17</sup>		3,00	18,6	10,1	9,0	1,4		13,4	
Papillas <sup>18a</sup>		0,012- 0,014	0,045- 0,051	0,045- 0,056	0,10-0,13	0,11- 0,13		0,14-0,16	

<sup>a</sup>:  $\mu\text{g/g}$  muestra, <sup>b</sup>:  $\alpha + \beta$ -epoxi, EV: esterol vegetales, OH: hidroxi, k: ceto. 1: Azadmard-Damirchi and Dutta, 2009, 2: Bortolomeazzi et al., 2003, 3: Johnsson and Dutta, 2006, 4: Lambelet et al., 2003, 5: Zhang et al., 2006, 6: Kmiecik et al., 2009, 7: Dutta, 1997, 8: Dévoli et al., 2006, 9: Conchillo et al., 2005, 10: Husche et al., 2011, 11: Baumgartner et al., 2013, 12: Dutta and Appelqvist, 1996, 13: Dutta and Appelqvist, 1997, 14: Tabee et al., 2008, 15: Cercaci et al., 2006, 16: Zunin et al., 1998, 17: Menéndez-Carreño et al., 2008, 18: García-Llatas et al., 2008.

Cuadro n° 7b. Contenido individual de óxidos de campesterol en alimentos ( $\mu\text{g/g}$  lípidos).

Aceite	<b>6<math>\beta</math>-OH</b>	<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	<b>7<math>\beta</math>-OH</b>	<b><math>\beta</math>-epoxi</b>	<b><math>\alpha</math>-epoxi</b>	<b>triol</b>	<b>7-k</b>	<b>diOH</b>
Avellana <sup>1</sup>		0,1-0,3				0,4-1,0		
Cacahuete <sup>2-3</sup>		0,3-0,7	0,2-0,5	nd	0,3	0,8	nd	
Colza <sup>1,4,5</sup>	14,2-27,3	0,3-7,9	0,4-15,9	2,6	15,1	1,51	1,2-2,7	
Girasol <sup>2,6</sup>		0,3-1,9	0,2-1,5		0,9		nd	0,7
Maíz <sup>2-3</sup>		0,1-1,9	0,1-1,6	0,2	0,2	0,3	nd	
Oliva <sup>2,3</sup>		0,1-0,2	0,1	0,1	0,1	nd	nd	
Palma <sup>2,6</sup>		0,2-1,1	0,2		10,8		nd	1,7
Margarina <sup>7a</sup>		<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	1,08	
Margarina + EV <sup>3,7-9a</sup>		0,8-2,5	<0,3-2,8	<0,3	<0,3-1,6	<0,3	1,3-5,8	
Patatas fritas <sup>6,10-12</sup>		0,1-1,4	0,1-2,8		0,2-61,9 <sup>b</sup>	0,2	0,1-9,2	0,1-1,6
Repostería <sup>13a</sup>							0,3-0,7	
Leche + EV <sup>14</sup>		3,8	8,0	7,7	7,4	2,0	12,0	
Papillas <sup>15</sup>		0,009-0,010	0,02-0,024	Nd	0,012-0,013	nd	0,017-0,020	

<sup>a</sup>: $\mu\text{g/g}$  muestra, <sup>b</sup>: $\alpha + \beta$ -epoxi, nd: no detectado, EV: esteroleos vegetales, OH: hidróxi, k:ceto.1: Azadmard-Damirchi and Dutta, 2009, 2: Bortolomeazzi et al., 2003, 3: Johnsson and Dutta, 2006, 4: Lambelet et al., 2003, 5: Kmiecik et al., 2009, 6: Dutta, 1997, 7: Conchillo et al., 2005, 8: Husche et al., 2011, 9: Baumgartner et al., 2013, 10: Dutta and Appelqvist, 1996, 11: Dutta and Appelqvist, 1997, 12: Tabee et al., 2008, 13: Cercaci et al., 2006, 14: Menéndez-Carreño et al., 2008, 15: García-Llatas et al., 2008.

En algunos de los alimentos detallados en el **cuadro n° 7** (aceite de girasol, maíz, oliva y cacahuete), también se han cuantificado óxidos del estigmasterol, sin embargo los contenidos son inferiores que en el caso de  $\beta$ -sitosterol o campesterol, no superando los 4  $\mu\text{g/g}$  lípidos (Johnsson and Dutta, 2006). En general, los óxidos mayoritarios detectados y cuantificados en los alimentos (ver **cuadro n° 7a y 7b**) son los hidroxí ( $7\alpha$  y  $7\beta$ ) y los 7-cetoderivados del  $\beta$ -sitosterol (puesto que es el EV mayoritario en los alimentos), aunque en algunos casos, como en las patatas fritas, los  $\alpha/\beta$ -epóxidos y los trioles pueden encontrarse en mayores proporciones.

Recientemente, se ha analizado el contenido en POPs de diferentes tipos de ingredientes utilizados para el enriquecimiento en EV de alimentos (ver **cuadro n° 8**). El contenido de POPs oscila entre 1,70-27,12  $\mu\text{g}/100$  g de ingrediente (7,61-31,39  $\mu\text{g}/100$  g EV). Los autores sugieren que la diferencia entre ingredientes, contenido total de POPs y perfil obtenido, es debido a los diversos procedimientos de obtención, origen, presencia de otros ingredientes (maltodextrina, inulina, ácido cítrico, conservantes, sucrosa, jarabe de glucosa, caseinato sódico, extractos ricos en tocoferoles, ascorbil palmitato, ascorbato sódico, leche desnatada en polvo, agua, emulsificantes, estabilizantes, sorbato potásico, tocoferoles y/o antioxidantes), estado físico, concentración y forma química de los EV en el ingrediente, lo que condicionaría la susceptibilidad a la oxidación de los EV (González-Larena et al., 2011).

Cuadro n° 8. Contenidos de óxidos de esteroides vegetales ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  de ingrediente) en ingredientes utilizados en el enriquecimiento de esteroides vegetales en alimentos (González-Larena et al., 2011).

Origen	7 $\alpha$ -OHsitosterol	7 $\beta$ -OHsitosterol	Sitostanotriol	7-cetositosterol	Totales
Soja	0,87 $\pm$ 0,15	0,09 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,07	1,70 $\pm$ 0,16
Soja <sup>a</sup>	2,76 $\pm$ 0,38	1,73 $\pm$ 0,34	2,99 $\pm$ 0,52	6,39 $\pm$ 1,30	15,66 $\pm$ 2,85
Tall oil	0,59 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,03	0,61 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,14	2,89 $\pm$ 0,24
Tall oil	1,22 $\pm$ 0,14	1,30 $\pm$ 0,05	3,74 $\pm$ 0,09	1,58 $\pm$ 0,16	7,84 $\pm$ 0,40
Mezcla <sup>*b</sup>	0,96 $\pm$ 0,12	0,58 $\pm$ 0,05	1,90 $\pm$ 0,14	1,42 $\pm$ 0,18	4,86 $\pm$ 0,07
Mezcla <sup>*</sup>	6,59 $\pm$ 0,66	5,78 $\pm$ 0,26	4,63 $\pm$ 0,40	10,12 $\pm$ 0,30	27,12 $\pm$ 0,64
Girasol + tall oil	0,67 $\pm$ 0,07	0,61 $\pm$ 0,10	0,58 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,05	2,86 $\pm$ 0,21
Girasol alto oleico	1,53 $\pm$ 0,35	1,59 $\pm$ 0,08	1,41 $\pm$ 0,07	2,56 $\pm$ 1,56	7,08 $\pm$ 0,51

<sup>\*</sup>: a base de aceite de soja, colza, girasol y maíz, <sup>a</sup>: contiene 7-cetocampesterol (1,79  $\pm$  0,44  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  de ingrediente), <sup>b</sup>: esteroides vegetales esterificados.OH: hidroxilo.

El efecto del almacenamiento o procesado en la oxidación de los EV ha sido evaluado en diferentes estudios. En papillas para alimentación infantil almacenadas (25°C, 9 meses) (García-Llatas et al., 2008) o leche en polvo almacenada (22-38°C, 12 meses) (Soupas et al., 2006), se ha observado que los contenidos de POPs se ven incrementados durante el almacenamiento, si bien el porcentaje relativo de oxidación sigue siendo bajo, del 1,5% a 1,4% tras 9 meses de almacenamiento o, no varía prácticamente (0,2 - 0,4%), respectivamente. En referencia al procesado, Menéndez-Carreño et al. (2008), tras evaluar el efecto de diferentes tratamientos térmicos (horno Schaal (65°C, 24h), microondas (900 W, 1,5-2 min), calentamiento eléctrico (90°C, 15 min)) en leches comerciales enriquecidas en EV, concluyen que este alimento constituye una fuente adecuada para la ingesta de las cantidades recomendadas de EV puesto que el incremento de POPs en el alimento no es significativo tras los diferentes tratamientos. Sin embargo, recientemente se ha determinado el contenido de POPs en distintas matrices (chuletas de cerdo y de cordero, filetes de pescado congelado, pastas compuestas (trigo y huevo)) tras el proceso de cocción recomendado por el fabricante, mostrando que, en el producto original no se detecta presencia de POPs, si bien tras el procesado culinario, disminuyen los EV incrementándose el contenido de POPs (Derewiaka and Obiedzinski, 2012).

Se ha estimado la ingesta diaria de POPs a través de diferentes aceites (no enriquecidos) consumidos en la sociedad sueca (Johnsson and Dutta, 2006) sometidos o no a calentamiento a 180°C durante varias horas, con un contenido máximo de 18 µg de POPs/g aceite, lo que supondría, consumiendo 40 g al día de aceite, una ingesta inferior a 0,7 mg/día. En

alimentos comercializados enriquecidos en EV se ha cuantificado menos del 0,1 % de POPs (12-68  $\mu\text{g/g}$  margarina), que, con un consumo de 20-25 g de margarina al día, supondría una ingesta de 1,3-1,7 mg POPs/día (Grandgirard et al., 2004). Comparado con una dieta baja en colesterol (< 300 mg/día), esta ingesta aun es menor que la correspondiente a la de óxidos de colesterol (alrededor de 3mg/día) estimada en la sociedad holandesa y neo zelandesa (van de Bovenkamp et al., 1988, Lake and Scholes, 1997).

#### *2.4 Biodisponibilidad*

Dada la baja absorción de los EV en el tracto gastrointestinal humano, en general, se asume que la absorción de sus derivados oxidados (POPs) podría ser del mismo orden que la de los EV (Grandgirard et al., 1999). Se ha indicado que los COPs presentan una absorción menor que el colesterol, probablemente debido a la menor solubilidad de estos compuestos en las micelas, la menor esterificación en los enterocitos y/o el efecto citotóxico sobre las células de la mucosa intestinal (Osada et al., 1994).

A continuación se muestran los estudios relacionados con la absorción/captación de los POPs *in vivo* e *in vitro*.

##### *Estudios in vivo*

En los años ochenta, se detectó  $\alpha$ - y  $\beta$ - epoxisitosterol en el plasma de un paciente con macroglobulinemia de Waldenstroms (cáncer de células blancas) (Brooks et al., 1983). En suero de individuos con sitosterolemia

se han detectado principalmente óxidos de  $\beta$ -sitosterol ( $7\beta$ -hidroxi,  $\alpha$ -epoxy, triol y 7-ceto) (4210 - 4490 ng/mL suero) y de campesterol ( $7\alpha/\beta$ -hidroxi) sin llegar a cuantificar estos últimos (Plat et al., 2001). Sin embargo, en sujetos sanos, cuya dieta no incluye productos enriquecidos en EV, se han determinado  $7\beta$ -hidroxi y 7-cetositosterol (alrededor de 50 ng/mL de suero) (Plat et al., 2001),  $\beta$ -epoxi, triol,  $\alpha$ -epoxi, 7-cetositosterol y triol de campesterol (77,4 -169,1 ng/mL de plasma) (Grandgirard et al., 2004b), y  $7\alpha/\beta$ -hidroxisitosterol (alrededor de 96 ng/mL de suero) (Menéndez-Carreño et al., 2008). Estas cantidades son claramente inferiores a las cuantificadas en individuos con sitosterolemia. Por otro lado, en voluntarios sanos cuya dieta incluye una margarina enriquecida en EV (3g EV/día), el contenido sérico inicial de POPs es de 5,02 ng/mL y, tras el consumo de la margarina, 6,94 ng/mL, correspondiendo el mayor incremento a los hidroxiderivados (Husche et al., 2011). Sin embargo, en otro estudio reciente no se ha observado incremento en el contenido plasmático de POPs tras una ingesta similar (3g EV/día) vehiculizada del mismo modo (margarina) (Baumgartner et al., 2013). Señalar que los contenidos determinados en estos estudios oscilan entre 5 y 169,1 ng/mL de suero, cantidades comparables a los contenidos de COPs determinados en muestras biológicas de humanos sanos (3-154 ng/mL de suero) (Diczfalusy, 2004).

Existen pocos estudios donde se evalúe la absorción y distribución de los POPs en animales. La absorción linfática de los POPs se ha investigado en ratas alimentadas con óxidos individuales (7-ceto, epoxiderivados) o mezclas ( $7\alpha/\beta$ -hidroxi, epoxi-, triol-, y 7-cetoderivados) de  $\beta$ -sitosterol y campesterol, observando por una parte, que los derivados

de campesterol se absorben mejor que los del  $\beta$ -sitosterol (tal y como sucede en el caso de los EV) y por otra, que la captación depende de la estructura oxidada considerada (Grandgirard et al., 1999, Tomoyori et al., 2004). En diversos tipos de roedores (hámsters, ratones) alimentados con distintos contenidos (100-2500 ppm en la dieta) de mezclas de POPs, se ha determinado la absorción plasmática de estos compuestos mostrando que, además de la influencia de la cadena lateral y del efecto dosis dependiente observado (Grandgirard et al., 2004c), existe una mayor prevalencia de epóxidos en suero (Bang et al., 2008) o hidroxiderivados en plasma (Liang et al., 2011). Se ha evaluado la distribución de POPs en tejidos animales (aorta, corazón, riñones, hígado), observando una mayor prevalencia de los hidroxi- (Tomoyori et al., 2004, Liang et al., 2011), trioles (Grandgirard et al., 2004c) o epoxiderivados (Bang et al., 2008), lo que parece sugerir que los oxisteroles se absorben, metabolizan y acumulan de forma diferente *in vivo*.

Se debe de tener en cuenta que no se ha cuantificado directamente la absorción y, mientras que el contenido en linfa podría ser una buena aproximación de la captación de POPs, la cuantificación en plasma, suero y tejidos debería ser interpretada cuidadosamente, ya que la velocidad de absorción y excreción particular de cada estructura influyen en la determinación.

Estudios previos han observado que los epóxidos son parcialmente transformados en trioles en ratas (Grandgirard et al., 1999), probablemente debido a las condiciones ácidas de los jugos estomacales, como se ha descrito para el caso de los COPs (Maerker, 1988) o por la acción de una epoxi hidrolasa en las células intestinales capaz de catalizar dicha reacción



(Aringer and Eneroth, 1974). En tejidos y plasma de grupos control y de ratas alimentadas con bajas dosis de POPs (100 ppm), solo se determina sitostanol, lo que podría sugerir que este compuesto es excretado lentamente del organismo (Grandgirard et al., 2004c). Además, en un estudio paralelo, estos mismos autores indican que los derivados triol, no se forman *in vivo* a partir de los compuestos no oxidados (Grandgirard et al., 2004d). Por otro lado se ha constatado que el 7 $\alpha$ -hidroxistosterol no está presente en tejidos de hámsters alimentados con diferentes dosis de POPs (100-2500 ppm en la dieta) lo que podría sugerir la formación de ácidos biliares a partir de este compuesto, al igual como ocurre en el caso del 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol (Grandgirard et al., 2004c). Otros autores han determinado que el marcaje del 7-cetocolesterol y su administración a ratas, promueve la formación de 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (Lyons and Brown, 1999), lo que podría suceder de modo similar en el caso de los POPs. Más recientemente, dicha transformación se ha corroborado en el caso de los humanos, asumiendo que es debida al enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (Larsson et al., 2007).

#### *Estudios in vitro*

En células del hepatoma humano (HepG2), se ha determinado la captación y el transporte de los POPs, evaluando la absorción celular tras el tratamiento con distintas concentraciones de POPs individuales (7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi y 7-cetostosterol). Se observa un incremento en la captación dosis dependiente, sin embargo, la distribución de los mismos depende de la estructura considerada (7-ceto > 7 $\alpha$ -hidroxi > 7 $\beta$ -hidroxi) (Koschuning et al., 2009).

Además de su captación, se ha indicado que la transformación *in vitro* de estos compuestos puede originar otras estructuras. En aislados de mitocondrias de hígado de rata y en homogenizados de hígado de rata se ha observado que el  $\beta$ -sitosterol es oxidado principalmente en el anillo esteroideo (formando  $7\alpha/\beta$ -hidroxi, triol,  $\alpha/\beta$ -epoxi, 7-cetoderivados) (Aringer and Eneroth, 1973) pero también en la cadena lateral (generando 26-hidroxi y 29-hidroxi, principalmente) (Subbiah and Kuksis, 1969, Aringer and Eneroth, 1976, Aringer and Nordstrom, 1981), observándose en este último caso, trazas de 24/25-hidroxiderivados lo que podría sugerir que la existencia del grupo alquilo de los EV podría dificultar la formación de estos últimos productos de oxidación. En preparaciones de hígado de rata o de humanos, se ha observado la ausencia de capacidad de oxidación en la posición  $7\alpha$  (Aringer and Eneroth 1973, Aringer, 1980). Por otro lado, se ha constatado en fracciones de hígado de rata, la formación del  $\beta$ -epoxisitosterol por autooxidación es de 3 a 4 veces mayor que la del  $\alpha$ -epímero (Aringer and Eneroth, 1974), siendo ambos epóxidos, susceptibles de conversión para originar trioles, como se ha detallado en el apartado de *estudios in vivo*.

En fracciones subcelulares de hígado de rata, se ha demostrado que el  $7\alpha$ -hidroxisitosterol y el  $7\alpha$ -hidroxicolesterol sufren las mismas transformaciones convirtiéndose en  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta$ - y  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi- $5\beta$ -esteroides, siendo la conversión mucho menos efectiva en el caso del derivado de  $\beta$ -sitosterol (Aringer, 1975). En hepatocitos de hámsters, se ha indicado que el 7-cetositosterol puede transformarse en  $7\beta$ -hidroxisitosterol, sin proporcionar más detalles (Grandgirard et al., 2002). Por otro lado, en macrófagos y células de hepatoma humano

(HepG2), se ha descrito también la conversión del 7-cetocolesterol a 27-hidroxi-7-cetocolesterol catalizada el enzima CYP27A1 del citocromo P450 (Brown et al., 2000, Lyons and Brown, 2001).

En la **figura nº 8 y 9** se detallan el esquema del diseño experimental realizado y el desarrollo del mismo relacionado con la difusión de resultados.



Figura nº 8. Esquema del diseño experimental.

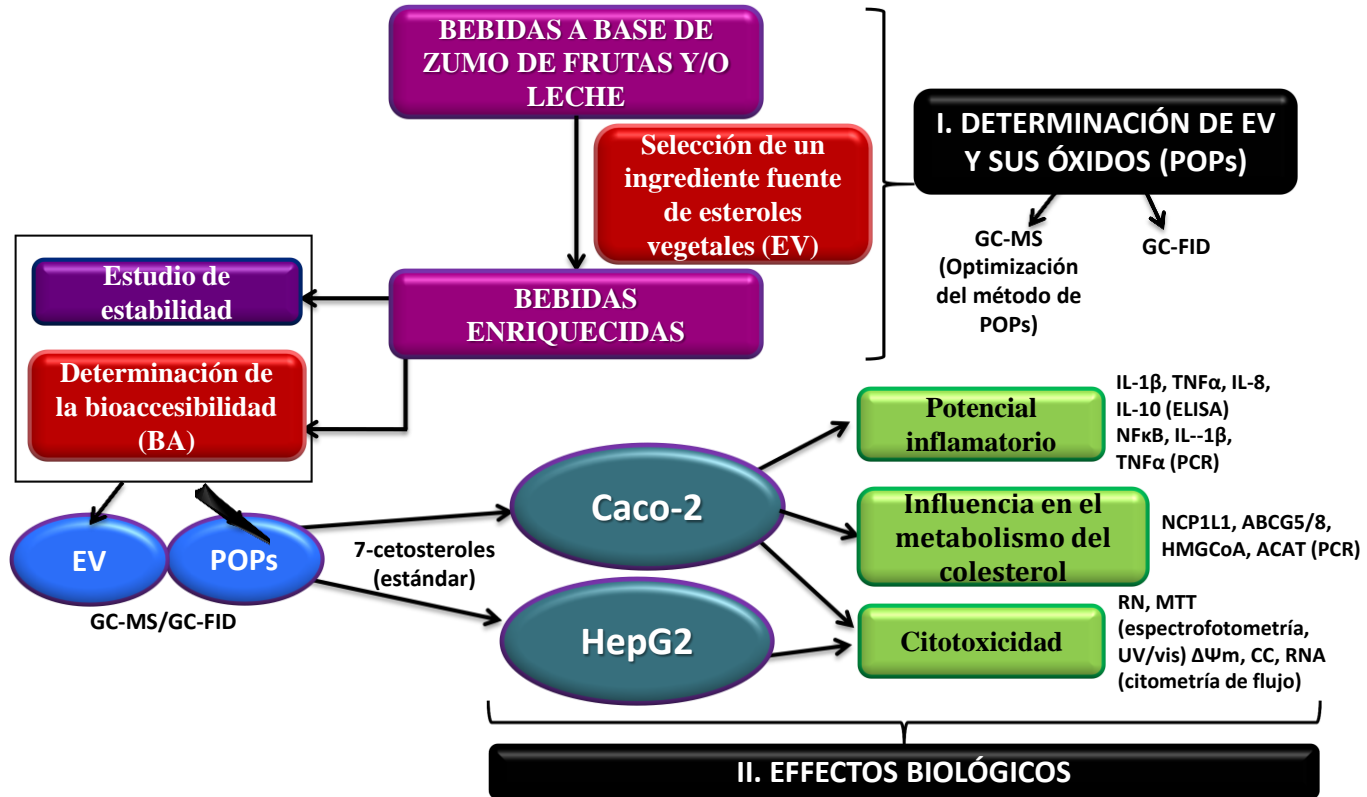
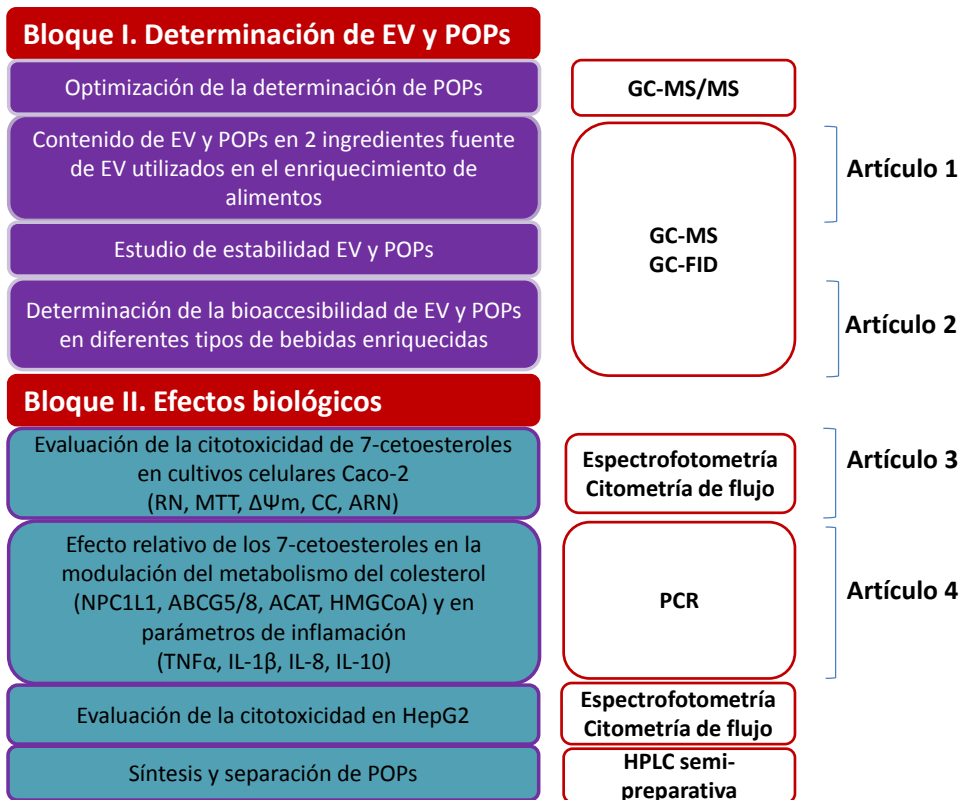




Figura nº 9. Desarrollo del diseño experimental. Relación con la difusión de resultados.







**RESULTADOS**

***RESULTS***



**BLOQUE I. DETERMINACIÓN DE ESTEROLES  
VEGETALES Y SUS ÓXIDOS EN BEBIDAS A BASE DE  
ZUMO DE FRUTAS Y/O LECHE ENRIQUECIDAS EN  
ESTEROLES VEGETALES**



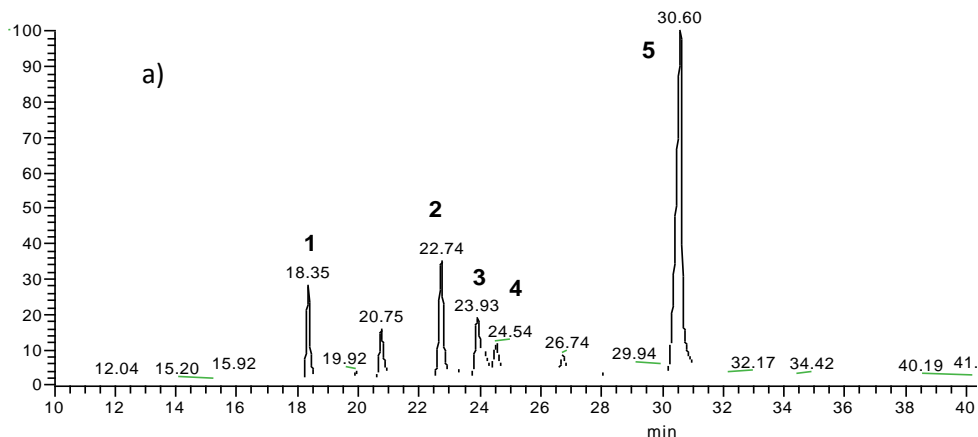
*1. Optimización de la identificación de óxidos de esteroides vegetales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas*

Dado que no existen POPs comercializados, a excepción del 7-cetoestigmasterol, para la obtención de espectros característicos de los mismos que permitan la identificación en las muestras, se ha procedido a su obtención por termooxidación de disoluciones patrón de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol por el procedimiento de Conchillo et al. (2005) (ver anexo II, apartado A.2 *identificación y cuantificación*).

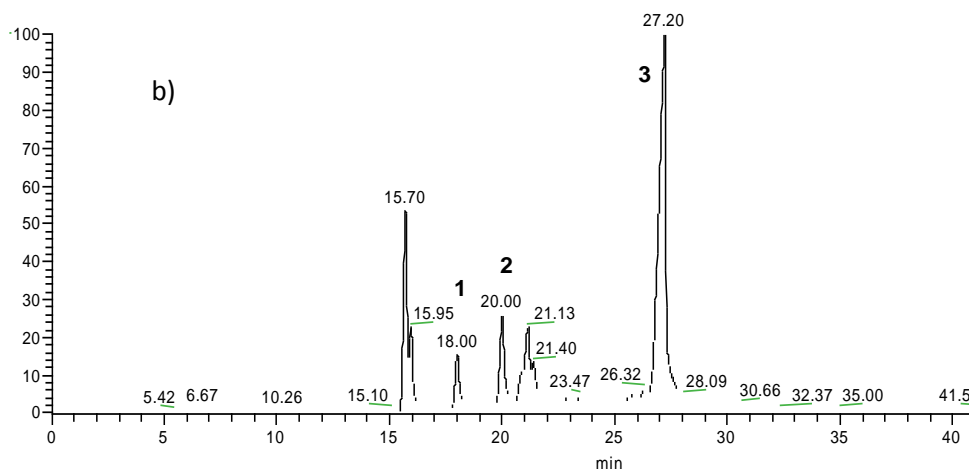
La identificación de los POPs se realiza por comparación de los espectros de masas obtenidos con los de los patrones de COPs (7 $\alpha$ / $\beta$ -hidroxi,  $\alpha$ / $\beta$ -epoxi, triol y 7-cetocolesterol), y con los iones característicos de los POPs descritos en la bibliografía (Grandgirard et al., 1999, Plat et al., 2001, Grandgirard et al., 2004, Conchillo et al., 2005, Zhang et al., 2005, Kemmo et al., 2008, Menéndez-Carreño et al., 2008, Husche et al., 2011, Derewiaka et al., 2012).

En la **figura n° 10** se muestra el cromatograma con los POPs identificados en las disoluciones patrón termooxidadas. En todas ellas se identifican los 7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi y 7-cetoderivados del esteroles correspondiente. Los  $\alpha$ - y  $\beta$ -epoxi solo se han identificado en las disoluciones termooxidadas de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

Figura n° 10. Óxidos de esteroides vegetales identificados en las disoluciones termooxidadas de  $\beta$ -sitosterol (a), campesterol (b) o estigmasterol (c).

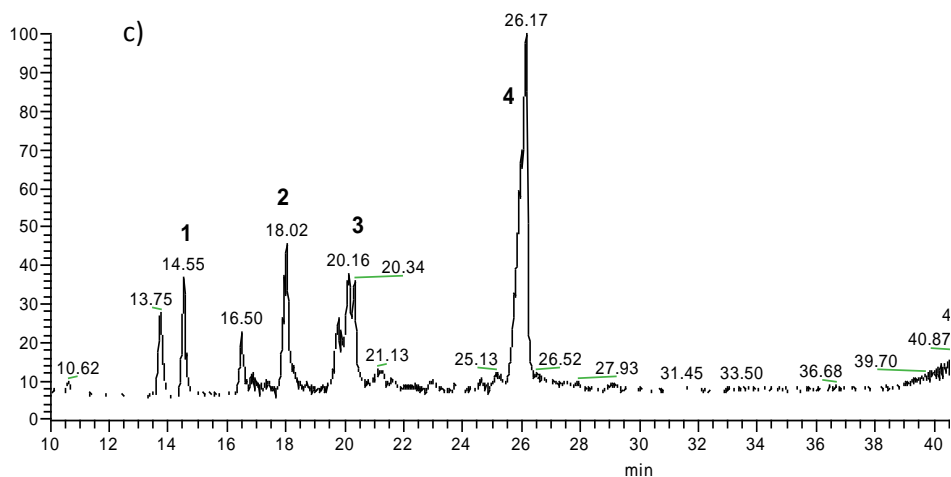


1:  $7\alpha$ -hidroxisitosterol; 2:  $7\beta$ -hidroxisitosterol; 3:  $\beta$ -epoxisitosterol; 4:  $\alpha$ -epoxisitosterol; 5: 7-cetositosterol.



1:  $7\alpha$ -hidroxicampesterol; 2:  $7\beta$ -hidroxicampesterol; 3: 7-cetocampesterol.

Figura n° 10. (continuación). Óxidos de esteroides vegetales identificados en las disoluciones termooxidadas de  $\beta$ -sitosterol (a), campesterol (b) o estigmasterol (c).



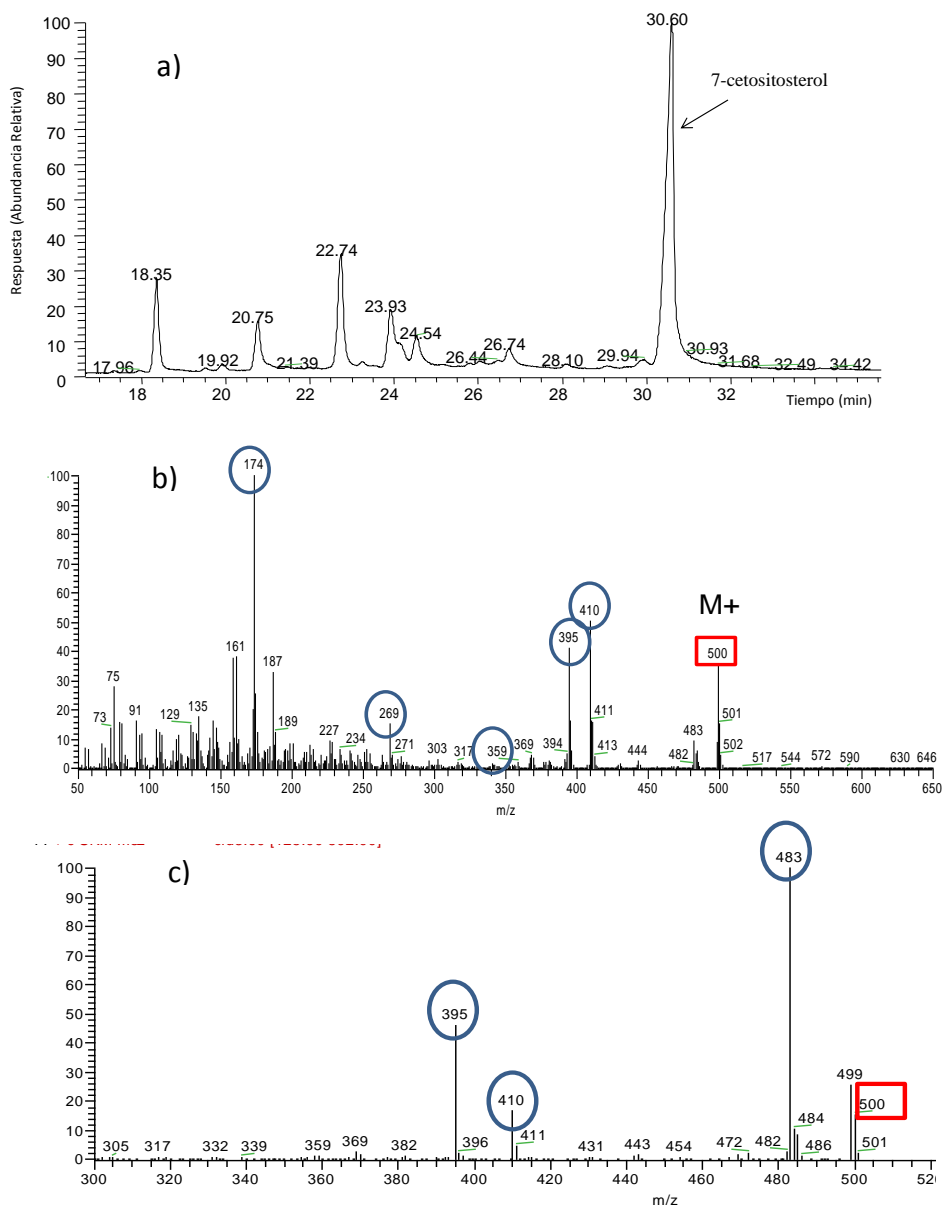
1:  $7\alpha$ -hidroxiestigmasterol; 2:  $7\beta$ -hidroxiestigmasterol; 3:  $\alpha/\beta$ -epoxiestigmasterol; 4: 7-cetoestigmasterol.

A continuación se procede a la optimización de un método de identificación y cuantificación de POPs por GC-MS/MS. Para ello, se trabaja con disoluciones patrón termooxidadas similares a las descritas anteriormente. Se ensayan distintas energías de colisión (EC) (1,0-3,7 eV) para cada uno de los POPs identificados anteriormente y se selecciona como óptima aquella que proporciona una abundancia relativa del ion precursor entre el 10 y el 20%.

A modo de ejemplo, en la **figura n° 11** se muestra el cromatograma y el espectro obtenido para el 7-cetositosterol por GC-MS y GC-MS/MS con la EC optimizada.



Figura nº 11. Cromatograma (a), espectro en GC-MS (b) y GC-MS/MS (c) relativo a la identificación de 7-cetositosterol. En rojo se indica el ion precursor y en azul los característicos.



En el **cuadro n° 9** se recogen los datos cromatográficos para la identificación y cuantificación de POPs por GC-MS.

Cuadro n° 9. Óxidos obtenidos por termooxidación de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol, identificados por GC-MS.

POPs	tr	trr	P	EC	Iones específicos
<b>POPs de <math>\beta</math>-Sitosterol</b>					
7 $\alpha$ -hidroxisitosterol	18,35	1,17	484	2,9	470, <b>469</b> , 379, 233
7 $\beta$ -hidroxisitosterol	22,74	1,45	484	2,9	470, <b>469</b> , 379, 233
$\beta$ -epoxisitosterol	23,93	1,52	396	2,0	<b>381</b> , 367,255, 213
$\alpha$ -epoxisitosterol	24,54	1,56	396	2,0	<b>381</b> , 367,255, 213
sitostanotriol	28,16	1,79	431	2,3	343, <b>341</b> ,301
7-cetositosterol	30,60	1,95	500	3,2	<b>483</b> ,410,395
<b>POPs de Campesterol</b>					
7 $\alpha$ -hidroxicampesterol	17,98	1,14	470	2,9	456, <b>455</b> ,442
7 $\beta$ -hidroxicampesterol	20,00	1,27	470	2,9	456, <b>455</b> ,442
7-cetocampesterol	27,20	1,73	486	3,3	485,470, <b>469</b> ,381
<b>POPs de Estigmasterol</b>					
7 $\alpha$ -hidroxiestigmasterol	14,55	0,89	482	2,9	468, <b>467</b> ,439,327
7 $\beta$ -hidroxiestigmasterol	18,02	1,09	482	2,9	468, <b>467</b> ,439,327
$\alpha/\beta$ -epoxiestigmasterol	19,80- 20,34	1,21	500	2,5	486, <b>485</b> ,481,471, 456,443, 410,382
7-cetoestigmasterol	26,17	1,57	498	3	482,455,408, <b>393</b>

POPs: óxidos de esteroides vegetales, tr: tiempo de retención (min), trr: tiempo de retención relativo frente al PI (19-hidroxicolesterol). P: ion precursor (m/z), EC: energía de colisión (eV) optimizada para MS/MS e iones específicos obtenidos a partir de la fragmentación (m/z). En negrita se indica el ion mayoritario.

*2. Sterol stability in functional fruit beverages enriched with  
different plant sterol sources*

## **Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources**

Laia Alemany-Costa<sup>a†</sup>, Marina González-Larena<sup>a†</sup>, Guadalupe García-Llatas<sup>a\*</sup>, Amparo Alegría<sup>a</sup>, Reyes Barberá<sup>a</sup>, Luis Manuel Sánchez-Siles<sup>b</sup>,  
María Jesús Lagarda<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia,  
Burjassot, Spain

<sup>b</sup> Research and Development Department, Hero Institute for Nutrition,  
Alcantarilla, Murcia, Spain

†Both authors have contributed equally to the study, and thus may be regarded as first author.

**Keywords:** *Plant sterols; phytosterol oxidation products, gas chromatography, phytosterol stability, sterol oxidation; functional foods.*

**Abbreviations:** *BHT: butylhydroxytoluene; COPs: cholesterol oxidation products; EU: European Union; Fb: fruit beverages; GC-FID: gas chromatography-flame ionization detection; GC-MS/MS: gas chromatography-tandem mass spectrometry; HMDS: hexamethyldisilazane; IS: internal standard; KCl: potassium chloride; KOH: potassium hydroxide; LDL: low-density lipoprotein; MFb: milk-based fruit beverages; POPs: phytosterol oxidation products; PS: plant sterols; Rf: response factor; SPE: solid-phase extraction; TMCS: trimethylchlorosilane; TMSE: trimethylsilyl ether.*

### **Abstract**

Two different plant sterol (PS) sources (free PS from tall oil and esterified PS from vegetable oils) were used for manufacturing two types of functional beverages (fruit and milk-based fruit beverages), and their PS and phytosterol oxidation product (POP) contents were determined. Gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was used for identification and gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) for quantitation purposes. Brassicasterol, campesterol, campestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and sitostanol were the quantified PS, conforming a profile in order with current legislation. The relative percentages of PS differed according to the enrichment source involved, though the enrichment levels (g/100g beverage) were of the same order (1.77 from tall oil and 1.84 from vegetable oils). Only POPs from  $\beta$ -sitosterol (the prevalent PS in the analyzed beverages) were detected - the predominant representative being 7 $\beta$ -hydroxysitosterol (39-58.5% of total POPs content). The following POPs were quantified: 7 $\alpha$ -hydroxy,  $\beta$ -epoxy,  $\alpha$ -epoxy, and 7-ketositosterol, yielding a total POPs content ranging between 42.9-57.4 mg/100 g of PS. No statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) in total and individual POPs content according to the source of PS were found. The mean  $\beta$ -sitosterol oxidation percentage was  $< 0.07\%$ , which reflected a low PS oxidation extent, though manufacture was on a laboratory scale regardless of the PS source used in enrichment of the functional beverages. These functional drinks therefore can be regarded as healthy food products and as an adequate PS vehicle as well.

## **1. Introduction**

Consumption of foods enriched with plant sterols (PS) (including phytosterols and phytostanols) may help reduce low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels. PS consumption (2 g/day) results in a cholesterol reduction of approximately 9%, exerts beneficial effects upon other lipid variables and, in addition, PS have been described as anti-inflammatory and anti-cancer compounds (Hernández-Mijares, Bañuls, Rocha, Morillas, Martínez-Triguero, Víctor, Lacomba, Alegría, Barberá, Farré, & Lagarda, 2010; Marangoni & Poli, 2010; García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011).

Plant sterols intake with the diet ranges from 150-440 mg/day, and can reach 1 g/day in vegans (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). Since the diet alone is unable to offer the effective intake required to deliver the health benefits of PS, a large variety of commercial foods have been enriched with free or esterified PS, including spreads, which were the first commercial applications of PS-enriched foods. Since the approval of spreads in the European Union (EU), several more approvals have been issued for the addition of phytosterol to other food categories such as milk-based fruit beverages (European Food Safety Authority, 2008). This kind of enrichment is a convenient and alternative way for consumers to obtain the daily recommended amount of PS for subjects with moderate hypercholesterolemia. In effect, these products can be regarded as healthy staple foods, since skimmed milk can be used for their formulation – thereby replacing milk fat with unsaturated fatty acids used in PS esterification. Furthermore, fruit juices can provide vitamins and antioxidants as well (Normen & Frohlich, 2004).

The main sources of PS for current functional foods and dietary supplements are tall oil, a by-product of the wood pulp industry, and vegetable oil deodorizer distillate. Tall oil contains a mixture of free and esterified PS in a proportion of less than 15%, whereas free sterols are a major component (15-30%) of the deodorizer distillate fraction obtained from refining plant or vegetable oils (Moreau, 2004; Fernandes & Cabral, 2007).

Like all unsaturated lipids, phytosterols are liable to oxidation, giving rise to a family of compounds termed oxyphytosterols or phytosterol oxidation products (POPs), which are structurally similar to cholesterol oxidation products (COPs) (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). While the negative biological effects of COPs have been extensively studied, and these compounds are now known to be implicated in the initiation and progression of major chronic diseases (atherosclerosis, neurodegenerative processes, diabetes, among others), the biological effects of POPs are still unclear and contradictory (Hovenkamp, Demonty, Plat, Lütjohann, Mensink, & Trautwein, 2008; Ryan, McCarthy, Maguire & O'Brien, 2009; Otaegui-Arrazola, Menéndez-Carreño, Ansorena, & Astiasarán, 2010; García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). As has been recently reported, the presence of POPs in enriched foods may come from the PS source used for enrichment (González-Larena, García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá, & Lagarda, 2011). Accordingly, several factors may contribute to their formation: the high temperatures involved in obtaining PS (Moreau, 2004), the different food characteristics (Ryan, McCarthy, Maguire & O'Brien, 2009), and the processing conditions employed after the addition of these functional ingredients to different



food matrices (Soupas, Huikko, & Lampi, 2006; Menéndez-Carreño, Ansorena, & Astiasarán, 2008).

Plant sterol content has been determined in several milk beverages enriched with free or esterified PS (Laakso, 2005; Soupas et al., 2006, Menéndez-Carreño, Ansorena, & Astiasarán, 2008; Saraiva, Castilho, Martins, Noronha da Silveira, & Ramos, 2011), and in orange juices fortified with sterol esters (Mezine, Zhang, Macku, & Lijana, 2003) and with a sterol concentrate (Clement, Hansen, Costin, & Perri, 2010). However, few studies to date have identified and quantified POPs in other foods, and the existing publications mostly focus on high lipid content matrixes (Dutta, 2002, Bortolomeazzi, Cordano, Pizzale, & Conte, 2003; Soupas, Huikko, Lampi, & Piironen 2007). In the case of dairy matrixes, 7-ketosterol contents have been determined as an indicator of phytosterol oxidation in milk-based infant foods (Zunin, Calcagno, & Evangelisti, 1998), and several POPs have been quantified in milk- and cereal-based infant foods (García-Llatas, Cercaci, Rodríguez-Estrada, Lagarda, Farré & Lercker, 2008). Plant sterol stability in enriched dairy products was determined for the first time by Soupas, Huikko & Lampi (2006), who reported POP contents in skimmed milk enriched with free or esterified PS. More recently, phytosterol oxides have been analyzed in commercial low-fat milk enriched with esterified phytosterols (Menéndez-Carreño, Ansorena, & Astiasarán, 2008).

To the best of our knowledge, no studies have been made to identify and quantify POPs in milk-based fruit beverages and fruit beverages, and since the biological effects of POPs are still unclear, the present study was designed to identify and quantify PS and POPs in such functional

beverages enriched with free or esterified PS of different origins, with a view to confirming that these beverages are adequate PS vehicles.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Reagents*

Standards: 5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol (epicoprostanol) (purity:  $\geq 95\%$ ) used as internal standard (IS) in PS determination, (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3-ol (stigmasterol) (purity: 95%), (24R)-ethylcholest-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) (purity: 95%), 24 $\alpha$ -ethyl-5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol (stigmastanol) (purity: 97.4%), cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol (7 $\beta$ -hydroxycholesterol) (purity: 95%), 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholestan-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -epoxycholesterol) (purity: 98%) and cholest-5-en-3 $\beta$ -ol-7-one (7-ketocholesterol) (purity: 90%), were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cholest-5-ene-3 $\beta$ ,19-diol (19-hydroxycholesterol) (purity: 95%) used as IS in POPs determination, cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol (7 $\alpha$ -hydroxycholesterol) (purity: 98.6%), (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol-7-one (7-ketostigmasterol) (purity: 98.6%) and (24R)-methylcholest-5-en-3-ol (campesterol) (purity: 98.6%) were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). (24R)-ethylcholest-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol, for POPs obtention by thermo-oxidation) (purity: 78.7%  $\beta$ -sitosterol, with campesterol and sitostanol traces) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

Chloroform, diethyl ether, methanol, anhydrous sodium sulfate, acetone, 2-propanol, and anhydrous pyridine were purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). Potassium hydroxide (KOH) was from Poch, S.A. (Sowinskięgo, Poland), potassium chloride (KCl)

from Panreac (Barcelona, Spain), butylhydroxytoluene (BHT) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and hexane from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Silylating reagents: hexamethyldisilazane (HMDS) was from Fluka (Buchs, Switzerland), and trimethylchlorosilane (TMCS) from Carlo Erba (Rodano, Italy). All reagents were analytical grade. Ultrapure water was obtained by means of a Millipore Q water purification system (Milford, MA, USA).

## *2.2 Samples*

Two fruit beverages (Fb) and two milk-based fruit beverages (MFb) were enriched with similar PS concentrations (1.7 g PS/ 100 g of beverage), using two different ingredients as source of PS (A: free PS from tall oil, and B: esterified PS from soybean, rapeseed, sunflower and corn oils). Since PS are insoluble in water, both ingredients were presented in microencapsulated powder form suitable for use in low fat beverages. Due to the different matrix characteristics, the products were made by two distinct processes in the Pilot Plant of the Hero Global Technology Center located in Alcantarilla (Murcia, Spain), at laboratory scale. Briefly, Fb were made by mixing the microencapsulated PS with the fruit juices using high-speed mixing equipment at 27000 rpm (Polytron PT2000, Kinematica AC, Switzerland), two-step homogenization (GEA Nitro Soavi S.p.A, Italy) at 150 bars (100+50), pasteurization at 90°C during 30 sec and hot filling (at 80 °C) in 100 ml plastic bottles. These samples contained concentrated tangerine juice, water, banana puree, grape concentrate and banana flavor. MFb were manufactured in a way similar to Fb, except that the milk was previously acidified with part of the

fruit juices and stabilized with a high-methoxyl pectin in order to prevent protein flocculation. MFb contained reconstituted skimmed milk, concentrated tangerine juice, stabilizer (pectin) and aromas. The total PS concentrations were 1.773 g PS/100 g beverage and 1.842 g PS/100 g beverage for samples enriched with sources A and B, respectively. The nutritional information and physicochemical characteristics of the samples are detailed in **Table 1**.

**Table 1.** Fruit beverages: Nutritional information and physicochemical characteristics per 100 mL.

	<b>FbA</b>	<b>MFbA</b>	<b>FbB</b>	<b>MFbB</b>
Energetic value (KJ/Kcal)	340/80	304/72	354/83	311/73
Proteins (g)	0.3	2.7	0.3	2.7
Carbohydrates (g)	19.5	14.3	20.3	14.7
Lipids (g)	0.1	0.4	0.1	0.4
°Brix (20°C)	21.0	18.2	21.9	18.7
Ascorbic acid (mg/100 mL)	30.0	30.0	30.0	30.0
Titrateable acidity (g of citric acid)	1.3	1.2	1.3	1.2
PS source	free PS from tall oil	esterified PS from soybean, rapeseed, sunflower and corn oils		

FbA and FbB: Fruit beverage enriched with plant sterol source A (tall oil) or B (vegetable oils), respectively; MFbA and MFbB: milk-based fruit beverage enriched with plant sterol source A or B, respectively; PS: plant sterols.

### *2.3 Determination of plant sterols*

Lipids were extracted according to the procedure of Boselli, Velazco, Caboni, & Lercker, 2001. A weight of sample providing approximately 60 mg of PS was taken. Lipids were extracted with 40 mL of a chloroform:

methanol (1:1, v/v) mixture containing 0.05% of BHT (as antioxidant to avoid POPs artifact formation during saponification) and homogenized with a Polytron homogenizer (PT 2000, Kinematica AC, Switzerland) during 3 min at 250 W. After adding 20 mL of chloroform and mixing again with the Polytron, the sample was filtered (Whatman no. 1, 90 mm, Maidstone, England) through a Buchner funnel. To the filtrate, 10 mL of 1M KCl solution was added and refrigerated overnight. Then, after phase separation, the chloroform phase was concentrated in a rotary evaporator and dried with nitrogen.

The lipid fraction obtained (75 mg approximately) was processed by the method described by González-Larena, García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá, & Lagarda, 2011. Briefly, IS (2 mg of epicoprostanol) was added to the lipid fraction and hot saponification (3 mL of 1N KOH in methanol at 65°C during 1 h) was performed. The unsaponifiable material was then extracted with diethyl ether. A fraction of the unsaponifiable material (1/10) was subjected to derivatization with HMDS/TMCS in anhydrous pyridine (2:1:5). The trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives obtained were dissolved in hexane, filtrated (syringe-driven Millex-FH filter unit, 1 mL, 0.45 µm Millipore, Milford, MA, USA), and evaporated with nitrogen. The TMSE derivatives, dissolved in 250 µL of n-hexane, were analyzed by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) for identification and quantification purposes. One 1 µL was injected in a GC-FID (AutoSystem XL, Perkin-Elmer, Nortwalk, CT, USA) equipped with a CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness) capillary column (Chrompack-Varian, Middelburg, The Netherlands). The oven was initially programmed at 280°C maintained

during 20 min, heated to 290 °C at a rate of 0.7 °C/min, and kept during 5 min, then raised to 320 °C at rate of 30 °C/min. Finally, this temperature was maintained during 45 min. The carrier gas was hydrogen (0.7 mL/min). The temperature of both the injector port and the detector was 325 °C, and a split ratio of 1:10 was applied. PS were identified by comparing their retention times with those of the standards derivatized by the same procedure as the samples. For quantification, phytosterol calibration curves of brassicasterol (9.9 - 59.2 µg), campesterol (98.6 - 550.2 µg), stigmasterol (9.5 - 99.8 µg) and β-sitosterol (700.6 - 2398.8 µg) containing 200 µg of IS (epicoprostanol) were performed. The linear determination coefficients ( $R^2$ ) obtained for the different phytosterols were > 0.989. Quantification of phytostanols (campestanol and sitostanol) was performed using the response factor ( $R_f = 0.879$ ) calculated for stigmastanol standard (the only commercially available phytostanol) versus epicoprostanol (IS).

#### *2.4 Determination of phytosterol oxidation products*

Standards of POPs are not commercially available, except for 7-ketostigmasterol. Therefore, for the identification of POPs in beverages, mixtures of β-sitosterol, campesterol and stigmasterol oxides were thermo-oxidized and identified by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) (González-Larena, García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá, & Lagarda, 2011). Their collision energies were optimized and the identifying parameters for each phytosterol oxide were obtained as reported elsewhere.

For POPs determination in the samples, lipids were extracted with the same procedure as for PS (see section 2.3). With the lipid fraction obtained, we applied the method of González-Larena, García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá, & Lagarda, 2011. Briefly, IS (9.82  $\mu\text{g}$  of 19-hydroxycholesterol) was added to the extracted lipids. Cold saponification was performed at room temperature with 10 mL of methanolic 1N KOH, in darkness and under continuous agitation in an orbital shaker (IKA KS26, Stauffen, Germany) at 150 rpm during 18-20 h. The unsaponifiable material was extracted with diethyl ether. A fraction (1/2) of the unsaponifiable material was purified by SPE. The acetone fraction obtained was then subjected to derivatization by silylation, using the method described for PS (see section 2.3). The TMSE derivatives obtained were dissolved in 40  $\mu\text{L}$  of hexane, and 1  $\mu\text{L}$  was injected into GC-MS/MS for identification and GC-FID for quantification purposes. The GC-FID instrumental conditions were the same as for PS, except that the last holding time at 320  $^{\circ}\text{C}$  was lengthened by 20 min.

Quantification of POPs was performed by comparing the peak areas of the IS (19-hydroxycholesterol) and their analog COPs, with calculation of the Rf: 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (Rf = 1.14) for hydroxyphytosterols,  $\beta$ -epoxycholesterol (Rf = 0.72) for epoxyphytosterols, and 7-ketocholesterol (Rf = 1.15) for ketophytosterols. The Rf for 7-ketostigmasterol (1.12) was calculated and compared with that calculated for 7-ketocholesterol, to confirm the Rf values of the COPs with respect to the POPs.

### **3. Statistical analysis**

An ANOVA test ( $p < 0.05$ ) was applied to total PS or POPs and individual PS or POPs contents to evaluate possible differences according to the PS enrichment source and type of sample involved. The Statgraphics Plus version 5.1 (Rockville, MD, USA) statistical package was used throughout.

### **4. Results and discussion**

#### *4.1 Determination of plant sterols*

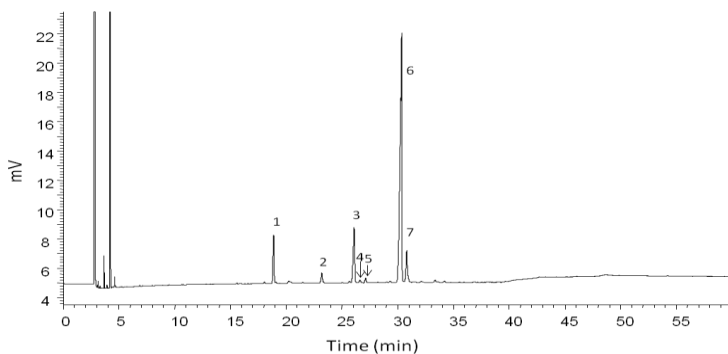
In the beverages subjected to study, the phytosterols campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol, and the phytostanols campestanol and sitostanol, were identified and quantified. In the MFbB and FbB samples (enriched with the source of esterified sterols), brassicasterol was also detected. As an example, Figure 1 shows a GC-FID chromatogram of the PS in the MFbB sample.

The PS contents of the analyzed beverages are summarized in Table 2. The PS totals ranged from 1.28-1.93 g/100 g of sample. The total PS contents of the beverages enriched with free PS (MFbA and FbA) were of the same order (1.34 g/100 g of sample) and 21.4% and 27.7% lower than the theoretical formulation (1.77 g PS/100 g beverage), respectively. The PS content of the MFbB and FbB samples (1.68 g/100 g sample) was higher than in A samples and more similar to the theoretical formulation specifications (1.84 g PS/100 g), though in the fruit beverage (FbB) the PS content obtained was 22.6% lower. These observations could be attributed



to several factors related to the processing conditions used at laboratory scale (such as speed of mixing, homogenization pressure and steps, time and temperature), or/and the stability/biocompatibility of the delivery system of each ingredient with food matrices used in this study. As an example, rupture of the encapsulated material due to one of the above mentioned factors may release the PS into the food matrix, and since PS are not water soluble, higher proportions of PS may be found on the surface. Thus, non-homogeneous dispersion of the PS may cause sampling error and would justify the presence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in total PS contents and in individual contents of  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol, campestanol and  $\beta$ -sitostanol, according to the source of PS used for enrichment, as well as, when considering the type of sample factor.

**Fig. 1** Plant sterols determination by GC-FID in milk-based fruit beverage (MFbB).



1: epicoprostanol (IS), 2: brassicasterol, 3: campesterol, 4: campestanol, 5: stigmasterol, 6:  $\beta$ -sitosterol, 7: sitostanol.

In all the samples,  $\beta$ -sitosterol was the most abundant phytosterol (>70%), followed by campesterol and stigmasterol (see Table 2). In the samples in which brassicasterol was detected (MFbB and FbB), the concentrations of the latter were similar to those of stigmasterol. The presence of brassicasterol in samples enriched with B source (vegetable oils) may be due to the fact that the PS source composition includes rapeseed oil, which is rich in this phytosterol (Piironen, Toivo, & Lampi, 2000; Phillips, Ruggio, Toivo, Swank, & Simpkins, 2002). Low or undetectable brassicasterol contents and lesser contents of campesterol in tall oil versus vegetable oils have been described by Cantrill & Kawamura (2008). These observations coincide with our own results, with 2.2- and 3.7-fold higher campesterol and campestanol contents, respectively, in the samples containing sterol source B (vegetable oils) than in those containing sterol source A (tall oil).

Phytostanol contents were detected at amounts always lower than the respective phytosterols. Sitostanol was more abundant than campestanol, with a 1.5- to 2.3-fold higher concentration in the samples containing sterol source A (tall oil) versus the samples containing sterol source B (vegetable oils). This coincides with the observations of Cantrill & Kawamura (2008), who reported higher phytostanol contents in oils from tall oil than from vegetable oils. In this sense, in samples enriched with A source (free sterols from tall oil), the PS profile obtained ( $\beta$ -sitosterol > sitostanol > campesterol > campestanol) (Table 2) also agrees with those reported by Maki, Shinnick, Seeley, Veith, Quinn, Hallissey, Temer & Davidson (2003) and Jones, Vanstone, Raeini-Sarjaz, & St-Onge (2003) in beverages enriched with ingredients of tall oil origin, although no

campesterol in the beverages of Jones, Vanstone, Raeini-Sarjaz, & St-Onge (2003) was reported.

The differences found in the sterol profile in PS-enriched foodstuffs in the literature in comparison with our own samples could be attributed to the origin of the sterols used in enrichment, as recently confirmed by Gonzalez-Larena García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá, & Lagarda, (2011) in several PS ingredients. In two studies with orange juices, samples enriched with esterified PS (Mezine, Zhang, Macku & Lijana (2003) (PS origin not specified) and PS from vegetable oils (Devaraj, Jialal, & Vega-López, 2004), a PS profile in which the predominant representative was  $\beta$ -sitosterol (40-50%) in a proportion lower than that found in our study (see Table 2) was reported. The percentage ranges in turn obtained for stigmasterol and campesterol were 20-23% and 25-27%, respectively, which were far higher than the levels recorded in our samples.

It should be noted that in the European Union, PS enrichment of milk-based fruit beverages is allowed, though addition to fruit beverages has not yet been approved. In contrast, in other countries such as Canada, the United States and New Zealand, the enrichment of fruit beverages is permitted. As can be seen in Table 2, the beverages comply with PS profiles specified by the European Commission (European Commission Decision 2004/336) for milk-based fruit beverages, since the PS contents are lower than the maximum authorized level (3 g of PS per container or daily serving), and the relative percentages of each phytosterol abide with the legal specifications: <80%  $\beta$ -sitosterol, <40% campesterol, <30%

## *Resultados*

---

stigmasterol, <3% brassicasterol, <15% sitostanol, <5% campestanol, <3% other sterols/stanols.

**Table 2** Phytosterol and phytostanol contents (values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates). Different superscript letters denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples.

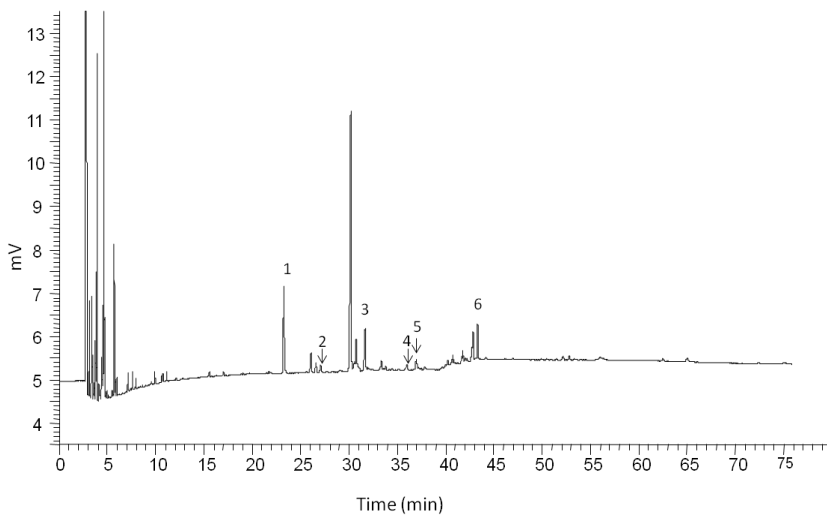
	<b>MFbA</b>	<b>MFbB</b>	<b>FbA</b>	<b>FbB</b>
Total PS (g/100 g)	1.393 $\pm$ 0.032 <sup>a</sup>	1.930 $\pm$ 0.322 <sup>b</sup>	1.281 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>	1.425 $\pm$ 0.098 <sup>a</sup>
Relative percentages (g/100 g PS)				
Brassicasterol	ND	1.81 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	ND	1.90 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Campesterol	5.69 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	12.71 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	5.64 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	12.78 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
Stigmasterol	1.49 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.71 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	1.54 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	1.98 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
$\beta$ -Sitosterol	79.10 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	75.50 $\pm$ 1.40 <sup>b</sup>	79.30 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	70.63 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>
Campestanol	1.26 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.88 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	1.35 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	4.58 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>
Sitostanol	12.47 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	5.37 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	12.18 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	8.13 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>

PS: plant sterols; ND: not detectable; FbA and FbB: Fruit beverage enriched with plant sterol source A (tall oil) or B (vegetable oils), respectively; MFbA and MFbB: milk-based fruit beverage enriched with plant sterol source A or B, respectively.

#### 4.2 Determination of phytosterol oxidation products

A GC-FID chromatogram of the POPs identified in MFbB is shown in Figure 2.

**Fig. 2** Phytosterol oxidation products determination by GC-FID in milk-based fruit beverage (MFbB).



1: 19-hydroxycholesterol (IS), 2:  $7\alpha$ -hydroxysitosterol, 3:  $7\beta$ -hydroxysitosterol, 4:  $\beta$ -epoxysitosterol, 5:  $\alpha$ -epoxysitosterol, 6: 7-ketositosterol.

Only POPs corresponding to  $\beta$ -sitosterol were detected ( $7\alpha$ -hydroxysitosterol,  $7\beta$ -hydroxysitosterol,  $\alpha$ - and  $\beta$ -epoxysitosterol and 7-ketositosterol), which would agree with the fact that it is the predominant sterol in the analyzed beverages (see Table 2). Regardless of the sterol source used in enrichment, the same oxides were detected in all the samples.

The POP contents are shown in Table 3. The prevalent oxide was 7 $\beta$ -hydroxysitosterol (39-58.5% of total POPs), followed by 7-ketositosterol (13.6-23.7%) - except in MFbA, where the second most abundant oxide was  $\beta$ -epoxysitosterol (24.6%), with a percentage similar to that of 7-ketositosterol. In the samples containing milk (MFbA and MFbB), the  $\beta$ -epoxysitosterol content was greater than that of 7 $\alpha$ -hydroxysitosterol, while in the samples without milk (FbA and FbB) this order was seen to be inverted. The total amount of POPs found ranged between 42.9 mg/100 g of PS in sample MFbB and 57.4 mg/100 g of PS in MFbA (or between 0.58 and 0.83 mg/100g beverage). There were no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) in total POP contents or in the different oxides according to the sterol source used for enrichment (free (A) or esterified (B)). In a tripalmitin matrix (Soupas, Huikko, Lampi, & Piironen, 2005), it was reported that at low temperatures ( $\leq 100^{\circ}\text{C}$ ) and times under 24 h, free  $\beta$ -sitosterol and campesterol oxidize to a lesser proportion than the esterified forms. At a temperature of  $180^{\circ}\text{C}$ , free PS oxidized slightly more than esterified PS. Moreover, the lowest proportion of POPs corresponded to sitostanol, independently of the temperature and of whether this PS was free or esterified.

We know of no other studies identifying and/or quantifying POPs in food matrixes similar to those analyzed in the present study. As both MFbA and MFbB contain milk, the discussion of results can be made between the POP contents of our samples and the scant information available in the literature involving dairy matrixes. In milks enriched with phytosterols (free or esterified), Soupas, Huikko & Lampi, (2006) identified  $\beta$ -sitosterol oxides (hydroxide, epoxy and 7-keto derivatives),

though only the 7-hydroxy and 7-ketoderivatives were quantified. The total content, which was considered low, was 218  $\mu\text{g}$  POPs/100 g of milk in the samples enriched with free phytosterols, and 203  $\mu\text{g}$  POPs/100 g of milk in the samples enriched with esterified phytosterols – such contents being lower than those recorded in our study. The lesser enrichment in phytosterols (0.5%) versus that used in our study (1.77-1.84%) would justify the observed differences in POPs contents. Accordingly, Menéndez-Carreño, Ansorena & Astiasarán (2008) detected total POP contents of 180  $\mu\text{g}/100$  g in an enriched milk with phytosterol esters (0.3%), which is similar to the observations of Soupas, Huikko & Lampi, (2006). Regarding individual POP abundance, 7 $\beta$ -hydroxysitosterol was the main POP, followed by 7-ketositosterol (Menéndez-Carreño, Ansorena & Astiasarán, 2008). However, and regardless of the chemical PS form (free or esterified), the prevalent POP in our beverages was 7 $\beta$ -hydroxysitosterol. Hydroxy-, epoxy-, triol- and keto-derivatives of  $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol have been identified and quantified in phytosterol-enriched milk (Menéndez-Carreño, Ansorena & Astiasarán, 2008),  $\beta$ -epoxy derivatives of  $\beta$ -sitosterol being more abundant than  $\alpha$ -epoxy. This was also the case in our milk-containing samples (see Table 3).

In milk based infant foods not enriched with PS, Zunin, Calcagno & Evangelisti (1998) reported 7-ketositosterol contents as a marker of phytosterol oxidation ranging between 5.8 – 115.8  $\mu\text{g}/100$  g of dried sample. In another study by our group, POP contents from  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and campesterol were determined in milk and cereal based infant foods (García-Llatas, Cercaci, Rodríguez-Estrada, Lagarda, Farré &



Lercker, 2008), resulting in 7-ketoderivatives of  $\beta$ -sitosterol > stigmasterol > campesterol. The total POP contents were low (0.9-16.1  $\mu$ g of POPs/100 g of sample), though these foodstuffs were not enriched with PS. Unlike in the present study, the predominant oxide was 7-ketositosterol, followed by  $\alpha$ -epoxysitosterol.

The mean oxidation percentages of  $\beta$ -sitosterol obtained from our samples, according to the source of PS used in enrichment, were low (0.069 g POPs/100 g  $\beta$ -sitosterol for samples enriched with free PS (FbA and MFbA) and 0.068 g POPs/100 g  $\beta$ -sitosterol (for the source B samples (FbB and MFbB)). Thus, no difference in the  $\beta$ -sitosterol oxidation percentage is considered when free or esterified PS are used as enrichment source in these functional beverages prepared at laboratory scale. In the same way as in skimmed milk enriched with PS, similar oxidized  $\beta$ -sitosterol was reported with esterified phytosterols enrichment as with free phytosterols (0.09% versus 0.08%, respectively) (Soupas, Huikko & Lampi, 2006). In a milk enriched with esterified phytosterols, (Menéndez-Carreño Menéndez-Carreño, Ansorena & Astiasarán, 2008) a lower  $\beta$ -sitosterol oxidation percentage (0.04%) was obtained. However, the oxidation percentages obtained both in our samples and in the mentioned studies involving milk matrixes can be considered low, independently of the PS source used for enrichment. Consequently, PS-enriched fruit and milk-based fruit beverages can be regarded as suitable PS vehicles.

## Resultados

**Table 3** Contents of phytosterol oxidation products (POPs) (mg /100 g of PS) (values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates). Different superscript letters denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples.

	MFbA		MFbB		FbA		FbB	
	mg/100g PS	relative % <sup>a</sup>	mg/100g PS	relative %	mg/100g PS	relative %	mg/100g PS	relative %
7 $\alpha$ -hydroxysitosterol	4.619 $\pm$ 0.845 <sup>ab</sup>	8.05	2.566 $\pm$ 0.448 <sup>b</sup>	5.98	7.123 $\pm$ 3.279 <sup>a</sup>	13.72	6.004 $\pm$ 0.927 <sup>a</sup>	10.78
7 $\beta$ -hydroxysitosterol	22.350 $\pm$ 1.785 <sup>a</sup>	38.94	22.372 $\pm$ 4.183 <sup>a</sup>	52.20	28.305 $\pm$ 7.504 <sup>ab</sup>	54.49	32.605 $\pm$ 4.612 <sup>b</sup>	58.52
$\beta$ -epoxysitosterol	14.116 $\pm$ 1.127 <sup>a</sup>	24.59	6.530 $\pm$ 0.444 <sup>b</sup>	15.23	2.467 $\pm$ 0.170 <sup>c</sup>	4.75	5.346 $\pm$ 3.051 <sup>b</sup>	9.59
$\alpha$ -epoxysitosterol	2.737 $\pm$ 0.136 <sup>a</sup>	4.77	3.136 $\pm$ 0.873 <sup>a</sup>	7.32	4.989 $\pm$ 2.289 <sup>a</sup>	9.61	4.204 $\pm$ 2.210 <sup>a</sup>	7.54
7-ketositosterol	13.574 $\pm$ 1.913 <sup>a</sup>	23.65	8.262 $\pm$ 0.963 <sup>a</sup>	19.27	9.051 $\pm$ 2.507 <sup>a</sup>	17.43	7.553 $\pm$ 1.808 <sup>a</sup>	13.57
Total POPs	57.396 $\pm$ 4.821 <sup>a</sup>		42.866 $\pm$ 2.504 <sup>b</sup>		51.935 $\pm$ 8.454 <sup>ab</sup>		55.712 $\pm$ 2.941 <sup>ab</sup>	

<sup>a</sup>: calculated with respect to total POPs content; PS: plant sterols; FbA and FbB: Fruit beverage enriched with plant sterol source A (tall oil) or B (vegetable oils), respectively; MFbA and MFbB: milk-based fruit beverage enriched with plant sterol source A or B, respectively.

## **5. Conclusions**

Two different PS ingredients used for food enrichment were employed for manufacturing two types of functional beverages (milk-based fruit and fruit beverages). The PS profile and contents in the analyzed samples were concordant with current legislation, and reflected differences previously reported among diverse commercially available ingredients used for PS enrichment. The order of PS abundance was  $\beta$ -sitosterol > campesterol > stigmasterol  $\approx$  brassicasterol. The PS oxidation stage in the samples, while slightly higher than others found in the literature referred to dairy products, was low regardless of the PS source used in enrichment – a fact that must be taken into account due to the existing inconclusive information on the biological effects of POPs. Only  $\beta$ -sitosterol oxides were detected, which is logical, since this is the predominant PS in the samples. The  $\beta$ -sitosterol oxidation percentage was around 0.07%, which reflects the limited extent of PS oxidation in the beverages, though laboratory scale conditions were used for producing them. In summary, the present paper for the first time offers information on the PS and POP contents in PS-enriched milk-based fruit beverages and fruit beverages, regarded as functional foods. Further studies are needed to evaluate PS stability and POP contents in enriched foods, and their relation to the enrichment source used, as well as the physiological effects that may result from their consumption.

### Acknowledgements

We thank Hero España, S.A. for providing the samples. This study was financed by AGL2008-02591-C02-01 (CICYT-FEDER) and partially funded by Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063. Thanks are also due to the *Generalitat Valenciana* (Spain) for financial support (GVACOMP2011-195) of the Bionutest group, and to R. López-Cermeño for her technical assistance in the Pilot Plant. Marina González-Larena holds a Danone grant from the *Instituto Danone* (Spain), and Laia Alemany-Costa holds a grant from the *Generalitat Valenciana* (Spain).

### References

Bortolomeazzi, R., Cordano, F., Pizzale, L., & Conte, L.S. (2003). Presence of phytosterol oxides in crude vegetables oils and their fate during refining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2394-2401.

Boselli, E., Velazco, V., Caboni, M.F., & Lercker, G. (2001). Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917, 239-244.

Cantrill, R., & Kawamura, Y. (2008). Phytosterols, phytosterols and their esters. Chemical and Technical Assessment for the 69th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). (Accessed March 2012).

Clement, L.M., Hansen, S.L., Costin, C.D., & Perri, G.L. (2010). Quantitation of sterols and steryl esters in fortified foods and beverages by GC/FID. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 973-980.

Devaraj, S., Jialal, I., Vega-López, S. (2004). Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24, 25-28.

Dutta, P.C. (2002). Determination of phytosterol oxidation products in foods and biological samples. In F. Guardiola, P.C. Dutta, R. Codony, & G.P. Savage (Eds.), *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects* (pp. 335-374). Champaign: AOCS Press.

European Commission Decision 2004/336/EC of 31 March 2004 authorising the placing on the market of yellow fat spreads, milk based fruit drinks, yoghurt type products and cheese type products with added phytosterols/phytosterols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L105, 49-51.

European Food Safety Authority (EFSA). (2008). A report from the data collection and exposure unit in response to a request from the European Commission: Consumption of food and beverages with added plant sterols in the European Union. *European Food Safety Authority Journal*, 133, 1-21.

Fernandes, P., & Cabral, J.M.S. (2007). Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98, 2335–2350.

García-Llatas, G., & Rodríguez-Estrada, M.T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 607-624.

García-Llatas, G., Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M.T., Lagarda, M.J., Farré, R., & Lercker, G. (2008). Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 469-475.

González-Larena, M., García-Llatas, G., Vidal, M.C., Sánchez-Siles, L.M., Barberá, R., & Lagarda, M.J. (2011). Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 3624–3631.

Hernández-Mijares, A., Bañuls, C., Rocha, M., Morillas, C., Martínez-Triguero, M.L., Víctor, V.M., Lacomba, R., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. & Lagarda, M.J. (2010). Effects of phytosterol ester-enriched low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake. *British Journal of Nutrition*, *11*, 1-8.

Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R.P., & Trautwein, E.A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research*, *47*, 37-49.

Jones, P.J.H., Vanstone, C.A., Raeini-Sarjaz, M., & St-Onge, M.P. (2003). Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *Journal of Lipid Research*, *44*, 1713-1719.

Laakso, P. (2005). Analysis of sterols from various food matrices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *107*, 402–410.

Maki, K. C., Shinnick, F., Seeley, M. A., Veith, P. E., Quinn, L. C., Hallissey, P. J., Temer, A., & Davidson, M.H. (2003). Food products containing free tall oil-based phytosterols and oat beta-glucan lower serum

total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic adults. *Journal of Nutrition*, *133*, 808-813.

Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, *61*, 193–199.

Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2008). Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 9997-10002.

Mezine, I., Zhang, H., Macku, C., & Lijana, R. (2003). Analysis of plant sterol and stanol esters in cholesterol-lowering spreads and beverages using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5639-5646.

Moreau, R.A. (2004). Plant sterols in functional foods. In P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals* (pp. 317-345). New York: Marcel Dekker Inc.

Normen, L., & Frohlich, J. (2004). Role of plant sterols in cholesterol lowering. In P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals* (pp. 243-315). New York: Marcel Dekker Inc.

Otaegui-Arazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., 2010. Oxysterols: a world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 3289–3303.

Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., & Simpkins, A.H. (2002). Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*, 123-142.

Piironen, V., Toivo, J., & Lampi, A.M. (2000). Natural sources of dietary plant sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 619-624.

Ryan, E., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., & O'Brien, N.M. (2009). Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Reviews International*, 25, 257-174.

Saraiva, D., Castilho, M.C., Martins, M.R., Noronha da Silveira, M.I., & Ramos, F. (2011). Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 4, 28-34.

Soupas, L., Huikko, L., & Lampi, A.M. (2006). Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, 222, 266-273.

Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., & Piironen, V. (2005). Esterification affects phytosterol oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 107-118.

Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., & Piironen, V. (2007). Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chemistry*, 101, 286–297.

Zunin, P., Calcagno, C., & Evangelisti, F. (1998) Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *Journal of Dairy Research*, 65, 591-598.



*3. Estabilidad de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas de zumo de frutas y leche*

Se determina la estabilidad de EV y sus óxidos en dos bebidas a base de zumo de mandarina (rico en  $\beta$ -criptoxantina), plátano y uva y leche desnatada (FbMa), o a base de zumo de uva y plátano con leche desnatada (FbMb). Estas bebidas, elaboradas en planta piloto, han sido enriquecidas en EV libres (procedentes de *tall oil*) (ingrediente seleccionado en el apartado anterior) y se utilizan en el marco de un estudio de intervención en humanos para evaluar la biodisponibilidad *in vivo* de EV. La información nutricional de estas bebidas, se detalla en el **cuadro n° 10**.

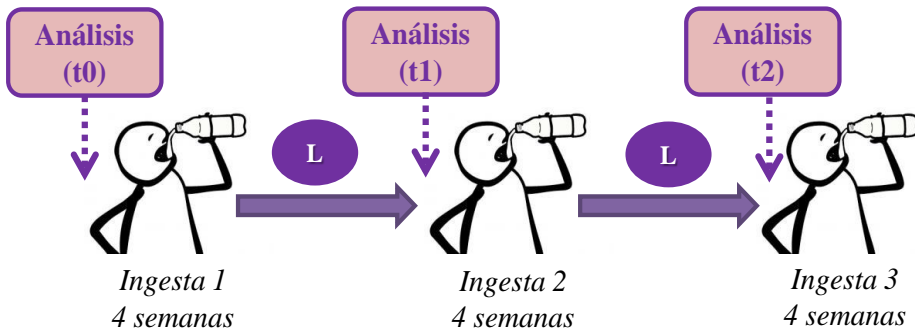
Cuadro n° 10. Información nutricional de las bebidas a base de zumo y leche enriquecidas en EV utilizadas en el estudio de intervención clínica.

	FbMa		FbMb	
	Teórico	Análisis	Teórico	Análisis
Valor energético (KJ/Kcal)	193/45,4	210/49,6	201/47,4	212/50,0
Proteínas (g)	2,2	1,5	2,2	1,6
Hidratos de carbono (g)	9,2	9,1	8,7	8,8
Lípidos (g)	0,2	0,8	0,2	0,9
$\beta$ -criptoxantina ( $\mu$ g)	400	300	-	-
Esteroles vegetales (g)	0,8	0,6	0,8	0,6

FbMa: bebida a base de zumo de frutas (con  $\beta$ -criptoxantina) y leche. FbMb: bebida a base de zumo de frutas (sin  $\beta$ -criptoxantina) y leche. Ambas enriquecidas en esteroles vegetales libres procedentes de *tall oil*.

En la **figura n° 12** se muestra el esquema del estudio de intervención clínica, así como los tiempos en los que se analizan las bebidas.

Figura n° 12. Representación esquemática del estudio de intervención.



t0: tiempo inicial, t1: 2 meses y t2: 4 meses. L: lavado (4 semanas)

En la **cuadro n° 11** se muestran los contenidos de los diferentes EV en las bebidas analizadas al inicio de los distintos periodos de tiempo.

## Resultados

Cuadro n° 11. Contenidos de esteroles vegetales (mg/100 g bebida) en las bebidas de zumo de frutas y leche (FbMa, FbMb).

	FbMa			FbMb		
	t0 (inicial)	t1 (2 meses)	t2 (4 meses)	t0 (inicial)	t1 (2 meses)	t2 (4 meses)
<b>Campesterol</b>	33,74 ± 2,95 (5,53)	35,51 ± 3,16 (5,62)	35,49 ± 1,95 (5,65)	34,02 ± 1,73 (5,52)	33,93 ± 1,56 (5,58)	34,53 ± 0,96 (5,69)
<b>Estigmasterol</b>	9,40 ± 0,68 (1,54)	9,59 ± 0,76 (1,52)	10,22 ± 0,44 (1,63)	9,29 ± 0,45 (1,51)	10,71 ± 1,37 (1,71)	9,43 ± 0,59 (1,55)
<b>β-Sitosterol</b>	483,03 ± 39,42 (79,12)	500,41 ± 34,42 (79,24)	496,84 ± 0,36 (79,08)	487,34 ± 20,52 (79,06)	480,79 ± 26,88 (79,12)	481,02 ± 16,64 (79,24)
<b>Campestanol</b>	7,79 ± 0,66 (1,28)	7,87 ± 0,67 (1,24)	7,89 ± 0,36 (1,26)	7,93 ± 0,42 (1,29)	7,67 ± 0,31 (1,27)	7,68 ± 0,35 (1,26)
<b>Sitostanol</b>	76,47 ± 0,79 (12,53)	78,17 ± 5,25 (12,38)	77,89 ± 4,21 (12,40)	77,88 ± 3,47 (12,63)	74,74 ± 4,64 (12,33)	74,42 ± 2,81 (12,26)
<b>EV totales</b>	610,43 ± 48,91	631,55 ± 44,21	628,32 ± 37,77	616,46 ± 26,57	607,83 ± 34,07	607,08 ± 21,05

FbMa: bebida a base de concentrado de frutas (rico en β-criptoxantina) y leche enriquecida con esteroles vegetales. FbMb: bebida a base de concentrado de frutas (sin β-criptoxantina) y leche enriquecida con esteroles vegetales. EV:esteroles vegetales. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar de tres repeticiones (entre paréntesis se detallan los porcentajes relativos).

El perfil de EV es similar para todas las muestras analizadas ya que ambas matrices han sido enriquecidas con el mismo ingrediente (*tall oil*). El  $\beta$ -sitosterol es el más abundante seguido del campesterol y, finalmente, del estigmasterol. El brasicasterol no se detecta, puesto que el ingrediente fuente de esteroides vegetales, no contiene este esteroide (González-Larena et al., 2011). En los fitostanoles se observa la misma pauta: sitostanol > campestanol.

Los contenidos de EV en ambas bebidas son similares entre ellos y no se observa, en ningún caso, una disminución del total ni de los compuestos individuales en función del tiempo, lo que pone de manifiesto la estabilidad de los EV. No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), ni en la misma muestra a lo largo de los tiempos evaluados, ni entre las distintas muestras para cada uno de los EV determinados. Este hecho es acorde al observado en un estudio de estabilidad (0-6 meses) de EV en matrices similares (bebidas a base de zumo y/o leche) enriquecidas con *tall oil* (González-Larena et al., 2012). En este estudio, no se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en el contenido total e individual de EV en función del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, estos autores indican que existe un efecto matriz ya que determinan, en general, un mayor contenido total e individual de los EV en el zumo de frutas ( $p < 0,05$ ) que en la matriz formulada a base de zumo de frutas y leche o leche únicamente (González-Larena et al., 2012).

Como se observa en el **cuadro nº 11**, ninguna de las muestras analizadas supera la cantidad de fitosteroides o fitostanoles (3 gramos) permitida en las bebidas a base de leche con EV añadidos (Decisión de la

Comisión 2004/336/CE). Además, los porcentajes relativos para cada uno de los EV son acordes a la legislación vigente (< 80%  $\beta$ -sitosterol, < 40% campesterol, < 30% estigmasterol, < 3% brasicasterol, < 15% sitostanol, < 5% campestanol y < 3% otros esteroides) (Decisión de la Comisión 2004/336/CE).

Dado que estos compuestos presentan insaturaciones, son susceptibles de oxidación dando lugar a POPs. Estos compuestos son también indicadores de la estabilidad oxidativa de los EV. Los contenidos de los POPs detectados en las bebidas analizadas se detallan en los **cuadros nº 12 y 13**.

En las bebidas a base de zumo de frutas y leche analizadas, solo se han detectado óxidos de  $\beta$ -sitosterol, lo que es acorde con los resultados obtenidos en las bebidas utilizadas previamente para la selección del ingrediente fuente de EV (ver apartado 2). Sin embargo, en este caso también se identifica y cuantifica el sitostanotriol.

El contenido total de POPs en ambas bebidas enriquecidas en EV, aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) en función del tiempo de almacenamiento (salvo en t2 de FbMb). La abundancia relativa de los diferentes POPs depende del tiempo y la muestra considerada, si bien, en todos los casos, el óxido mayoritario es el 7-cetositosterol, y el minoritario, el 7 $\alpha$ -hidroxisitosterol.

Cuadro n° 12. Contenidos de óxidos de esteroides vegetales (mg/100 g esteroides vegetales) en FbMa.

	<b>t0 (inicial)</b>	<b>t1 (2 meses)</b>	<b>t2 (4 meses)</b>
<b>7<math>\alpha</math>-hidroxistosterol</b>	0,88 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup> (5,97)	1,76 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup> (8,36)	1,99 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup> (8,22)
<b>7<math>\beta</math>-hidroxistosterol</b>	2,97 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup> (19,94)	3,88 $\pm$ 0,95 <sup>ab</sup> (18,59)	4,34 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup> (17,85)
<b><math>\beta</math>-epoxistosterol</b>	2,62 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup> (17,64)	3,39 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup> (16,30)	5,58 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup> (22,95)
<b><math>\alpha</math>-epoxistosterol</b>	2,70 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup> (18,10)	3,22 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup> (15,46)	3,33 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup> (13,79)
<b>sitostanetriol</b>	1,07 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup> (7,14)	2,52 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup> (12,10)	2,95 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup> (12,21)
<b>7-cetostosterol</b>	4,66 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup> (31,21)	6,13 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup> (29,19)	6,07 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup> (24,98)
<b>POPs totales</b>	14,91 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	20,88 $\pm$ 1,25 <sup>b</sup>	24,24 $\pm$ 1,68 <sup>c</sup>

POPs: óxidos de esteroides vegetales. FbMa: bebida a base de concentrado de frutas (rico en  $\beta$ -criptoxantina) y leche enriquecida con esteroides vegetales. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas en el óxido determinado en función del tiempo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones (entre paréntesis se detallan los porcentajes relativos).

Cuadro n° 13. Contenidos de óxidos de esteroides vegetales (mg/100 g esteroides vegetales) en FbMb.

	<b>t0 (inicial)</b>	<b>t1 (2 meses)</b>	<b>t2 (4 meses)</b>
<b>7<math>\alpha</math>-hidroxistosterol</b>	1,16 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup> (7,82)	1,83 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup> (7,55)	2,22 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup> (8,17)
<b>7<math>\beta</math>-hidroxistosterol</b>	3,03 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup> (20,38)	4,86 $\pm$ 1,30 <sup>ab</sup> (19,76)	5,76 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup> (20,95)
<b><math>\beta</math>-epoxistosterol</b>	2,51 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup> (16,83)	4,65 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup> (19,28)	5,27 $\pm$ 1,29 <sup>b</sup> (18,95)
<b><math>\alpha</math>-epoxistosterol</b>	2,41 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup> (16,38)	2,84 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup> (11,63)	3,98 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup> (14,62)
<b>sitostanetriol</b>	2,09 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup> (14,26)	1,92 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> (7,96)	2,34 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup> (8,69)
<b>7-cetostosterol</b>	3,57 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup> (24,33)	7,17 $\pm$ 1,16 <sup>b</sup> (33,81)	7,97 $\pm$ 2,01 <sup>b</sup> (28,63)
<b>POPs totales</b>	14,77 $\pm$ 2,53 <sup>a</sup>	23,27 $\pm$ 2,53 <sup>b</sup>	27,54 $\pm$ 4,12 <sup>b</sup>

POPs: óxidos de esteroides vegetales. FbMb: bebida a base de concentrado de frutas (sin  $\beta$ -criptoxantina) y leche enriquecida con esteroides vegetales. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas en el óxido determinado en función del tiempo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones (entre paréntesis se detallan los porcentajes relativos).

Señalar que el proceso de elaboración de las bebidas (planta piloto) representa un factor importante en la formación de POPs ya que, como se puede constatar (ver apartado 2), el contenido de POPs determinados en las bebidas utilizadas para la selección del ingrediente fuente de EV (43-57 mg POPs/100g EV), es significativamente superior (alrededor de 4



veces) al contenido determinado en las bebidas utilizadas en el estudio de intervención clínica (15 mg POPs/100g EV en el tiempo inicial del estudio). En leche comercial enriquecida en EV (0,5%), sometida a 65°C durante 24h (equivalente al almacenamiento de 1 mes a T<sup>a</sup> ambiente), se observa un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del contenido de POPs (Menéndez-Carreño et al., 2008), lo que sería acorde con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral. No obstante, estos autores también determinan POPs de campesterol y estigmasterol en la leche utilizada, siendo los contenidos totales determinados superiores (210-309  $\mu\text{g}/100\text{g}$  leche) a los hallados en el presente estudio.

Por otro lado, en papillas no enriquecidas en EV almacenadas durante 9 meses, se observa, en general, que no existe incremento del contenido de POPs (57-70  $\mu\text{g}$  POPs/100 g muestra) en función del tiempo. Sin embargo, los contenidos en estas matrices son comparables a los obtenidos en el análisis de las bebidas enriquecidas en EV (91-167  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de bebida), indicando una mayor oxidación de los EV presentes en las papillas (García-Llatas et al., 2008).

Los porcentajes de oxidación, determinados en estas bebidas enriquecidas en EV, incrementan en función del tiempo de almacenamiento de 0,019 a 0,031% y de 0,019 a 0,035%, en FbMa y FbMb, respectivamente. Sin embargo, en todos los casos, son inferiores a los determinados en bebidas a base de zumo de frutas y leche enriquecidas en EV (0,07%) elaboradas a escala de laboratorio analizadas en el apartado 2 y en leche (0,04-0,09%) (Soupas et al., 2006, Menéndez-Carreño et al., 2008).

La presencia de  $\beta$ -criptoxantina no parece influir en la estabilidad de las bebidas, si bien es cierto que en la bebida no enriquecida en este carotenoide, existen también compuestos antioxidantes procedentes del zumo de uva utilizado en su elaboración.

*4. Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols  
and their oxides in enriched beverages*

**Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages**

Laia Alemany<sup>a</sup>, Antonio Cilla<sup>a</sup>, Guadalupe Garcia-Llatas<sup>a</sup>, Maria T. Rodriguez-Estrada<sup>b</sup>, Vladimiro Cardenia<sup>c</sup>, Amparo Alegría<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Nutrition and Food Science Area. Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Valencia), Spain

<sup>b</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Viale G. Fanin 40, 40127 Bologna, Italy

<sup>c</sup>Interdepartmental Centre for Agri-food Industrial Research, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Piazza Goidanich 60, 47521 Cesena, Italy

Running title: Bioaccessibility of plant sterols and their oxides in beverages

**Keywords:** *Plant sterol, simulated gastrointestinal digestion, sterol oxidation products, beverages.*

### **Abbreviations**

*BF: bioaccessible fraction, BHT: butylhydroxytoluene, BSA: bovine serum albumin, COPs: cholesterol oxidation products, Fb: fruit beverage, FbMa: fruit-based milk beverage with tangerine juice, FbMb: fruit-based milk beverage without tangerine juice, GC-FID: gas chromatography-flame ionization detection, GC-MS: gas chromatography mass spectrometer, HMDS: hexamethyldisilazane, IS: internal standard, KOH: potassium hydroxide, LDL: low-density lipoprotein, M: milk beverage, POPs: phytosterol oxidation products, PS: plant sterols, Rf: response factor, SIM: selected ion monitoring, SOPs: sterol oxidation products, SPE: solid phase extraction, TMCS: trimethylchlorosilane, TMSE: trimethylsilyl ether.*

### **Highlights**

*Influence of simulated digestion in sterols and their oxides content in fruit/milk beverages. Plant sterol oxidation products bioaccessibility was higher than plant sterol one. Bioaccessibility studies could be considered as a predictive model for in vivo situation.*

**ABSTRACT**

This study evaluates the bioaccessibility (percentage of soluble compound available for absorption) of plant sterols (PS) and their oxides (phytosterol oxidation products, POPs) after simulated gastrointestinal digestion in fruit (Fb), milk (M) and fruit-based milk beverages with (FbMa) or without (FbMb) tangerine juice. In beverages and their bioaccessible fraction (BF), campesterol, campestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and sitostanol were detected. Bioaccessibility of total PS ranged between 2.62-6.48%, FbMb yielding the highest value, followed by FbMa > Fb > M. Campesterol/campestanol were the most bioaccessible PS. Only oxides of  $\beta$ -sitosterol were detected in beverages and BF (7 $\alpha$ -hydroxy, 7 $\beta$ -hydroxy,  $\beta$ -epoxy,  $\alpha$ -epoxy, sitostanetriol and 7-ksitosterol). Bioaccessibility of total POPs ranged between 19.08-49.29%, sitostanetriol yielding the highest value. Bioaccessibility of POPs was higher than that of PS, suggesting different patterns of solubility for these compounds.

## **1. Introduction**

Low-fat milk (Rideout, Chan, Harding and Jones, 2009; Saraiva, Castilho, Martins, Noronha da Silveira and Ramos, 2011) or orange juice (Devaraj, Autret and Jialal, 2006) enriched with 1–3 g/day of free or esterified plant sterols (PS) or stanols cause a significant decrease in serum total and LDL-cholesterol. Beverages, including fruit-skimmed milk beverages (where the addition of PS is allowed in the European Union) (European Commission Decision, 2004), are a convenient way for consumers to obtain the daily recommended amount of PS, because these products can be regarded as healthy staple foods.

One of the mechanisms by which PS can reduce cholesterol absorption is competition for space in mixed micelles in the lumen (Brufau, Canela and Rafecas, 2008). The molecular orientation is restricted by the fixed, long hydrophobic side-chain, which can be disadvantageous for fitting into the solubilization site. Thus, small differences in structure among sterols can have a great influence on selective solubilization in bile salt micelles (Matsouka, Kajimoto, Horiuchi, Honda and Endo, 2010).

Like other unsaturated lipids, PS are prone to oxidation, giving rise to a group of compounds termed phytosterol oxidation products (POPs). In the literature, there are contradictory results concerning the potential biological effects of POPs (Ryan, McCarthy, Maguire and O'Brien, 2009; Garcia-Llatas and Rodriguez-Estrada, 2011). The source of these compounds (food processing, storage and in vivo metabolic formation) is difficult to establish. They can be absorbed in small quantities through the diet, but it is also possible that they could be readily metabolized. From a

functional standpoint, it would be interesting to know not only the PS contents in foods but also their oxidative stability (POPs formation) and their bioaccessibility - the latter meaning the amount of an ingested compound that is available for absorption in the gut after digestion and use in physiological functions or storage (Fernandez-García, Carvajar-Lerida and Perez-Galvez, 2009).

To the best of our knowledge, there are no studies addressing the effect of gastrointestinal digestion on sterols and their oxides in foods. However, different solubility patterns of sterols have been reported in diverse model dietary mixed micelles composed of a lipid matrix and glycodeoxycholate, taurodeoxycholate or taurocholate; such behavior was related to the nature and composition of the mixed micelles. In general, cholesterol is the most soluble sterol in mixed micelles, followed by  $\beta$ -sitosterol and/or campesterol - stigmasterol being the least soluble. However, when affinity for the aqueous phase is considered, cholesterol still maintains the highest solubility, while for the main PS, campesterol in turn always presents higher solubility than sitosterol/sitostanol. This implies that structure plays a pivotal role in the solubility and transfer of these compounds to the aqueous phase (Armstrong and Carey, 1987; Hamada, Goto, Yamahira, Sugawara, Imaizumi and Ikeda, 2006; Matsuoka, Nakazawa, Nakamura, Honda, Endo and Tsukada, 2008; Matsuoka et al, 2010; Goncalves et al, 2011).

There are few data on the effects of simulated gastrointestinal digestion upon the solubility of sterols/stanols. In this context, Malaki Nik, Corredig and Wright (2011) evaluated the release and transfer of different lipophilic molecules (including PS) during in vitro gastroduodenal



digestion from oil-in-water emulsions (made of soy bean oil and aqueous soy protein isolate) to the aqueous phase during simulated digestion. The digestion procedure was performed with pepsin, pancreatin, colipase, phospholipase A2, bile extract and phospholipids. These authors found that, in the absence of lipolysis (without pancreatic lipase), transfer was mainly determined by molecular structure and partitioning within oil droplets, while the increase in partitioning into the aqueous phase was more rapid and manifest in the presence of pancreatic lipase. In orange juice containing multivitamin/multimineral tablets with PS or PS in powder, Bohn et al. (2007) investigated the effect of different fat-free phytosterol formulations upon cholesterol incorporation into mixed micelles during simulated gastrointestinal digestion (performed with pepsin and pancreatin-bile extracts). The evaluation of micellar cholesterol accumulation by Caco-2 cells was also carried out to determine at which step(s) PS decrease cholesterol transfer from the food matrix to absorptive epithelial cells. These authors showed that orange juice containing multivitamin/multimineral tablets with PS, and PS in powder, decrease cholesterol micellarization, even though PS solubility in mixed micelles or aqueous phase was not determined after simulated digestion in this study.

To our knowledge, few studies have evaluated the effect of gastrointestinal digestion on sterol solubility, and none have examined food sterol oxide solubility, in particular from fruit and/or milk beverages. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of gastrointestinal digestion in four fruit and/or milk-based beverages enriched in PS. For this purpose, the identification and quantification of sterols and their oxides was performed.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Samples**

Four beverages enriched with microencapsulated free PS from tall oil (0.8 g/100 mL of beverage), obtained at industrial scale, were used in this study: two skimmed milk-based fruit beverages with banana puree and grape juice from concentrate with or without tangerine fruit juice from concentrate rich in  $\beta$ -cryptoxanthin (FbMa and FbMb, respectively); one fruit beverage containing banana puree and grape juice from concentrate and tangerine fruit juice from concentrate rich in  $\beta$ -cryptoxanthin (Fb); and one skimmed milk-based beverage (M). Since PS are not water soluble, the ingredient was used as microencapsulated powder suitable for low fat beverages.

### **2.2 Chemicals**

5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol (epicoprostanol) (purity:  $\geq 95\%$ ) used as internal standard (IS) for PS determination, butylhydroxytoluene (BHT), glucuronic acid, bovine bile, bovine serum albumin (BSA), calcium chloride dehydrate, magnesium chloride, glucose, glucosamine hydrochloride, mucin from porcine stomach type II, pepsin from porcine stomach, sodium taurocholate,  $\alpha$ -amylase from human saliva, phospholipase A2 from porcine pancreas, lipase from human pancreas, cholesterol esterase from bovine pancreas and colipase from porcine pancreas, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cholest-5-ene-3 $\beta$ ,19-diol (19-hydroxycholesterol) (purity 95%), used as IS for POPs determination, was supplied by Steraloids (Newport,

RI, USA). Chloroform, diethyl ether, methanol, anhydrous sodium sulfate, acetone, 2-propanol, anhydrous pyridine, chloride acid (37%), uric acid, magnesium sulfate, sodium bicarbonate, ammonium chloride, potassium chloride, sodium chloride, sodium hydroxide, potassium dihydrogen phosphate and sodium dihydrogen phosphate were purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). Potassium hydroxide (KOH) and hexane were supplied by Poch, S.A. (Sowinskięgo, Poland) and J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), respectively. Pancreatin from porcine pancreas and hexamethyldisilazane (HMDS) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), whereas urea and trimethylchlorosilane (TMCS) were supplied by Carlo Erba (Rodano, Italy).

### **2.3 Simulated digestion**

Simulated digestion was performed according to Granado-Lorencio, Olmedilla-Alonso, Herrero-Barbudo, Blanco-Navarro, Pérez-Sacristán and Blázquez-García (2007). Briefly, 20 g of beverage (in quadruplicate) were transferred to an Erlenmeyer flask, and a saliva solution (9 mL, pH  $6.5 \pm 0.2$ ) containing organic and inorganic components and  $\alpha$ -amylase (0.19 mg) was added. This mixture was kept in a shaking water bath (37 °C, 90 rpm) for 5 min. Afterwards, 13.5 mL of gastric juice with organic and inorganic solutions, mucin, BSA and pepsin from porcine stomach (pH  $1.07 \pm 0.07$ ) was added. The mixture was incubated for 1 h under the same shaking water bath conditions. Then, 25 mL of duodenal juice (pH  $7.8 \pm 0.2$ ) and 9 mL of bile solution (pH  $8.0 \pm 0.2$ ) were introduced and, after neutralization of sample pH (6.8-7.2), human pancreatic lipase (1 unit), colipase (12.5  $\mu$ g), cholesterol esterase (5 units), phospholipase A2 (501.2

units) and sodium taurocholate (0.02 mg) were added. The final mixture was incubated for 2 h in the same shaking water bath. Finally, the samples were centrifuged for 90 min at 4000 rpm at 4 °C, to obtain the bioaccessible fraction (BF) of the digested samples.

The possible presence of cholesterol and its oxides in the digestion enzymes was evaluated, since it has been reported that bile extract used in the simulated digestion process can contain traces of these compounds (Bohn et al, 2007). Cholesterol ( $26.17 \pm 2.86 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ),  $7\alpha\text{-OH}$  cholesterol ( $4.94 \pm 0.63 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) and  $7\beta\text{-OH}$  cholesterol ( $8.33 \pm 1.83 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) were detected and quantified in digestion blanks ( $n = 4$ ). Therefore, in order to properly quantify the real amount of cholesterol and cholesterol oxides, these values were subtracted from those of BF.

## **2.4 Lipid extraction**

Lipids were extracted according to the procedure of González-Larena, García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá and Lagarda (2011). A sample amount that provided approximately 60 mg of PS was taken. Lipids were extracted with 40 mL of a chloroform:methanol mixture (1:1, v/v) containing 0.05% of BHT (as antioxidant to avoid POPs artifact formation during saponification) and homogenized with a Polytron homogenizer (PT 2000, Kinematica AC, Switzerland) during 3 min at 250 W. After adding 20 mL of chloroform and mixing again with the Polytron, the sample was filtered (Whatman no. 1, 90 mm, Maidstone, England) through a Buchner funnel. Ten mL of 1 M KCl solution were added to the filtrate and refrigerated overnight. Then, after phase separation, the

chloroform phase was concentrated in a rotary evaporator and taken to dryness under a nitrogen stream.

## **2.5 Sterols determination**

### **2.5.1 Beverages**

Plant sterols were extracted according to González-Larena et al. (2011). Briefly, 4 mg of epicoprostanol (IS) were added to the lipid fraction and hot saponification (3 mL of 1 N KOH in methanol at 65 °C during 1 h) was performed. The unsaponifiable material was then extracted with diethyl ether. A fraction of the unsaponifiable material (1/10) was subjected to derivatization with HMDS/TMCS in anhydrous pyridine (2:1:5, by volume). The trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives were dissolved in n-hexane, filtered (syringe-driven Millex-FH filter unit, 1 mL, 0.45 µm Millipore, Milford, MA, USA), and evaporated with nitrogen. The TMSE derivatives were dissolved in 250 µL of n-hexane and analyzed by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) for identification and quantification purposes, as previously described (Gonzalez-Larena et al, 2011).

For quantification, phytosterol calibration curves of brassicasterol (9.9-59.2 µg), campesterol (98.6-550.2 µg), stigmasterol (9.5-99.8 µg) and β-sitosterol (700.6-2398.8 µg) containing 400 µg of IS (epicoprostanol) were performed. The linear determination coefficients (R<sup>2</sup>) obtained for the different phytosterols were > 0.989. Quantification of phytosterols (campestanol and sitostanol) was performed using the response factor (R<sub>f</sub>) calculated for stigmasterol standard (the only commercialized

phytosterol) versus epicoprostanol (IS) ( $R_f = 0.879 \pm 0.096$ ), as well as in the case of cholesterol ( $R_f = 1.07 \pm 0.017$ ).

### **2.5.2 Bioaccessible fraction**

Five mL of bioaccessible fraction were added with 400  $\mu\text{g}$  epicoprostanol as IS and subjected to direct saponification with 10 mL of 2 N KOH (0.05% of BHT) at 65 °C for 1 h. The unsaponifiable material was then extracted with diethyl ether. All of the unsaponifiable material was used for PS quantification. After silylation, the TMSE derivatives were dissolved in 250  $\mu\text{L}$  of n-hexane and analyzed by GC-FID (HRGC 5300 Megaserie Carlo Erba Instruments), as previously reported (Cardenia, Rodríguez-Estrada, Cumella, Sardi, Della Casa and Lercker, 2011).

## **2.6 Determination of sterol oxidation products**

### **2.6.1 Beverages**

Sterol oxidation products were isolated with the same procedure as described by González-Larena et al. (2011). Briefly, 10  $\mu\text{g}$  of 19-hydroxycholesterol were added as IS to the extracted lipids. Cold saponification was carried out at room temperature with 10 mL of methanolic 1 N KOH, in darkness and under continuous agitation in a shaker at 150 rpm during 18-20 h. The unsaponifiable material was extracted with diethyl ether and dried under nitrogen. A fraction (1/2) of the unsaponifiable material was dissolved in hexane:diethyl ether (95:5, v/v) and purified by silica SPE (Supelclean LC-Si, 500 mg/3 mL)

(Supelco, Bellefonte, PA, USA)). After cartridge activation with hexane (5 mL), PS and impurities were removed with hexane (5 mL) and different solvents mixtures of hexane:diethyl ether (10, 30 and 10 mL of 95:5, 90:10, 80:20 (v/v), respectively). POPs were finally eluted with acetone (10 mL) and then subjected to silylation. The TMSE derivatives obtained were dissolved in 40  $\mu$ L of hexane, and 1  $\mu$ L was analyzed by GC-MS (GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan)), using the conventional GC-MS method suggested by Cardenia, Rodríguez-Estrada, Baldacci, Savioli and Lercker (2012), with minor modifications. The oven was programmed at 250 °C and maintained for 1 min, was and was then raised to 280 °C at a rate of 0.8 °C/min, then to 310 °C at rate of 5 °C/min, and kept at 310 °C for 12 min. The split ratio was 1:25.

Identification of sterol oxidation products (SOPs) was performed by SIM mode (m/z): IS (19OH-cholesterol) (353), 7 $\alpha$ -hydroxy(OH)sitosterol (484), 7 $\beta$ -OHsitosterol (484), sitostanetriol (431), 7-keto(k)sitosterol (500), 7 $\alpha$ -OHcholesterol (456), 7 $\beta$ -OHcholesterol (456), 7-kcholesterol (472). Considering that POP standards are not commercially available and that POPs fragmentation is similar to that of cholesterol oxidation products (COPs), SOP quantification was performed by using the calibration curves obtained for cholesterol oxides in the SIM mode (Cardenia et al, 2012).

### **2.6.2 Bioaccessible fraction**

Ten mL of the bioaccessible fraction of the digested samples were directly saponified with 20 mL of methanolic KOH 2N (0.05% BHT) in darkness and under continuous agitation in an orbital shaker at 150 rpm during 18-20 h at room temperature. After unsaponifiable extraction with

diethyl ether, the totality of this fraction was purified by SPE, as previously described. Derivatization and SOPs determination was carried out as described above in section 2.6.1.

The accuracy in the determination method of sterols (% recovery assay: 105.18 – 125.41%) and their oxides (% recovery assay: 111.02 – 116.27%) have been previously performed by our research group (González-Larena et al., 2011).

## **2.7 Statistical analysis**

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between PS or POPs contents in the same compound and in the same type of sample (beverage or BF or bioaccessibility) (within lines) or in the bioaccessibility of the same sample (FbMa, FbMb, Fb and M) (within columns). Statgraphics Plus version 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA) was used.

## **3. Results and discussion**

### **3.1 Sterols**

Table 1 shows the PS contents (mg PS/100 g of beverage) of beverages and their corresponding BF. Three of these beverages (FbMa, Fb and M) were previously analyzed in a storage stability study under different time and temperature conditions (González-Larena, Cilla, García-Llatas, Barberá and Lagarda, 2012). In all samples, the same



sterols/stanols were detected: campesterol, campestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, sitostanol and cholesterol.

**Table 1:** Sterol content in analyzed beverages and bioaccessible fraction (BF) expressed in mg/100 g beverage (relative percentage to total PS content is indicated in parenthesis).

	FbM <sub>a</sub>			FbM <sub>b</sub>			M			Fb		
	BEVERAGE <sup>a</sup>	BF	BA	BEVERAGE	BF	BA	BEVERAGE <sup>a</sup>	BF	BA	BEVERAGE <sup>a</sup>	BF	BA
Campesterol	36.73±0.60 <sup>a</sup> (5.71±0.05)	2.45±0.10 <sup>a</sup> (9.03±0.25)	6.66±0.27 <sup>a,w</sup>	34.53±0.96 <sup>b</sup> (6.69±0.12)	2.87±0.22 <sup>b</sup> (7.29±0.23)	8.31±0.65 <sup>b,w</sup>	42.39±0.79 <sup>c</sup> (5.71±0.04)	1.59±0.06 <sup>c</sup> (8.18±0.32)	3.75±0.15 <sup>c,w</sup>	37.82±0.21 <sup>a</sup> (5.76±0.03)	1.84±0.06 <sup>d</sup> (9.06±0.10)	4.88±0.16 <sup>d,w</sup>
Campestanol	8.23±0.11 <sup>a</sup> (1.28±0.01)	0.48±0.05 <sup>a</sup> (1.76±0.15)	5.79±0.55 <sup>a,x</sup>	7.68±0.35 <sup>b</sup> (1.26±0.02)	0.52±0.04 <sup>a</sup> (1.33±0.08)	6.82±0.57 <sup>b,w</sup>	9.48±0.16 <sup>c</sup> (1.28±0.01)	0.33±0.03 <sup>b</sup> (1.69±0.14)	3.47±0.35 <sup>c,w,x</sup>	8.45±0.16 <sup>a</sup> (1.29±0.02)	0.36±0.03 <sup>b</sup> (1.77±0.09)	4.27±0.35 <sup>c,x</sup>
Stigmasterol	10.05±0.20 <sup>a,b</sup> (1.56±0.01)	0.41±0.02 <sup>a</sup> (1.52±0.08)	4.02±0.11 <sup>a,y</sup>	9.43±0.59 <sup>a</sup> (1.55±0.05)	0.56±0.06 <sup>b</sup> (1.44±0.22)	5.96±0.60 <sup>b,w</sup>	11.21±0.25 <sup>c</sup> (1.51±0.01)	0.33±0.05 <sup>c</sup> (1.70±0.24)	2.95±0.44 <sup>c,y</sup>	10.37±0.20 <sup>b</sup> (1.58±0.03)	0.32±0.02 <sup>c</sup> (1.55±0.03)	3.04±0.17 <sup>c,y</sup>
β-Sitosterol	508.58±12.81 <sup>a</sup> (79.07±0.08)	21.112±0.19 <sup>a</sup> (77.97±0.44)	4.15±0.04 <sup>a,y</sup>	481.02±16.64 <sup>b</sup> (79.14±0.10)	30.90±2.42 <sup>b</sup> (78.53±0.54)	6.42±0.50 <sup>b,w</sup>	588.98±8.27 <sup>c</sup> (79.37±0.08)	14.76±0.42 <sup>c</sup> (75.88±0.20)	2.51±0.07 <sup>c,y</sup>	520.21±4.26 <sup>a</sup> (79.17±0.13)	15.26±0.54 <sup>c</sup> (74.94±0.09)	2.93±0.10 <sup>c,y</sup>
Sitostanol	79.62±1.91 <sup>a</sup> (12.38±0.02)	3.51±0.08 <sup>a</sup> (9.72±0.19)	4.41±0.10 <sup>a,y</sup>	74.42±2.81 <sup>b</sup> (12.26±0.07)	4.50±0.530 <sup>b</sup> (11.41±0.54)	6.05±0.71 <sup>b,w</sup>	90.01±0.35 <sup>c</sup> (12.13±0.13)	2.44±0.10 <sup>c</sup> (12.56±0.34)	2.71±0.12 <sup>c,y</sup>	80.22±1.59 <sup>a</sup> (12.21±0.13)	2.59±0.13 <sup>c</sup> (12.69±0.29)	3.22±0.16 <sup>c,y</sup>
Cholesterol	1.35±0.15 <sup>a</sup>	1.34±0.05 <sup>a</sup>	98.96±3.3 <sup>a,z</sup>	2.00±0.33 <sup>b</sup>	1.07±0.10 <sup>b</sup>	53.34±4.85 <sup>b,x</sup>	1.51±0.02 <sup>a</sup>	1.20±0.02 <sup>c</sup>	79.05±1.09 <sup>c,z</sup>	0.17±0.03 <sup>c</sup>	-	-
<b>Total PS</b>	<b>643.21±15.62<sup>a</sup></b>	<b>27.96±0.36<sup>a</sup></b>	<b>4.35±0.06<sup>a</sup></b>	<b>607.08±21.05<sup>b</sup></b>	<b>39.36±3.13<sup>b</sup></b>	<b>6.48 ± 0.52<sup>b</sup></b>	<b>743.05± 9.65<sup>c</sup></b>	<b>19.45±0.57<sup>c</sup></b>	<b>2.62 ± 0.08<sup>c</sup></b>	<b>657.17±8.60<sup>a</sup></b>	<b>20.36±0.76<sup>c</sup></b>	<b>3.10±0.11<sup>d</sup></b>

\*Data previously reported in González-Larena et al. (2012). All samples were analyzed at the same time and temperature. Different superscript letters denote significant differences ( $p < 0.05$ ) in the same compound and in the same kind of sample (beverage or BF or BA, within lines) (a - d) or in the BA of the same sample (FbM<sub>a</sub>, FbM<sub>b</sub>, M or Fb, within columns) (w-z). FbM<sub>a</sub>: Fruit (with tangerine) and milk based beverage with PS; FbM<sub>b</sub>: Fruit (without tangerine) and milk based beverage with PS; M: Milk with PS; Fb: Fruit beverage (with tangerine) with PS. BF: Bioaccessible fraction; BA: percentage of bioaccessibility (calculated as (PS content in BF\*100)/(PS content in beverage))

Total contents of PS in the beverages ranged between 607.08 and 743.05 mg/100 g of beverage; M had the highest PS amount, followed by Fb = FbMa > FbMb. As expected, cholesterol was the lowest quantified sterol (0.17-2.00 mg/100 g of beverage). In all beverages, the relative PS abundance was  $\beta$ -sitosterol > sitostanol > campesterol > stigmasterol > campestanol. The relative percentage of each compound with respect to the total content was similar in all samples ( $\beta$ -sitosterol  $\approx$  79%, sitostanol  $\approx$  12%, campesterol  $\approx$  6%, stigmasterol  $\approx$  2%, campestanol  $\approx$  1%), thus complying with the PS profiles specified by the European Commission for milk products and milk-based fruit beverages - the PS contents being lower than the maximum authorized level (3 g of PS per container or daily serving) (European Commission Decision, 2004). However, it should be taken into account that phytosterol addition to fruit beverages has not yet been approved in the European Union. In contrast, in other countries such as Canada, the United States and New Zealand, such enrichment is already allowed.

A statistically significant ( $p < 0.05$ ) decrease in PS content among beverages after digestion (19.45-39.36 mg/100 g of beverage) was observed in BF; the highest total PS content was detected in FbMb, followed by FbMa > Fb = M. In general, the order of PS contents was similar to that determined in beverages, except that campestanol and stigmasterol contents were quite close. In general, the relative percentages after the digestion process changed, those of campesterol and campestanol being enhanced, while those of  $\beta$ -sitosterol and sitostanol were reduced. Bioaccessibility of total PS was higher in FbMb (6.48%), followed by FbMa (4.35%), Fb (3.10%) and M (2.62%). For individual PS,

campesterol/campestanol bioaccessibility was generally highest (3.75-8.31%), followed by  $\beta$ -sitosterol, sitostanol and stigmasterol, with similar bioaccessibility values among them. These results are in agreement with those reported by Matsuoka et al. (2010), in which campesterol showed higher solubility in the aqueous phase than  $\beta$ -sitosterol. These authors demonstrated that increasing the length of the side-chain group at position 24 (ethyl for sitosterol and sitostanol versus methyl for campesterol and campestanol) progressively diminishes solubilization. In addition, another factor that supports the present findings is PS affinity for the bile salt micelles. In fact, different authors (Ikeda, Tanaka, Sugano, Vahouny and Gallo, 1988; Hamada et al, 2006; Matsuoka et al, 2008) found  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol to have higher affinity for the bile salt micelles than campesterol, consequently diminishing their aqueous solubility.

Mixed food matrix of fruit-milk beverage composition (FbMa and FbMb) seems better when PS bioaccessibility is considered compared with single samples (M and Fb). When comparing the same fruit juice containing samples with or without milk (FbMa and Fb), it was seen that the presence of milk increased bioaccessibility of total and individual PS, since milk lipids are an effective delivery system for highly lipophilic microconstituents (Baldi and Pinotti, 2008). Moreover, the sample with the highest total carotenoid content (Fb), previously determined by our group (González-Larena et al, 2012), had the lower PS bioaccessibility, suggesting that there could be an interaction between PS and carotenoids that might reduce PS incorporation to the micelles. This is also observed when FbMb (without tangerine juice rich in  $\beta$ -cryptoxanthin) is considered, showing higher total PS bioaccessibility than tangerine-

containing samples (Fb and FbMa). However, no interaction has been reported in carotenoids bioaccessibility in the presence of PS (Granado-Lorencio, Donoso-Navarro, Sánchez-Siles, Blanco-Navarro and Pérez-Sacristán, 2011).

Regarding cholesterol content, there is also a drop after digestion. It is interesting to note that cholesterol bioaccessibility (53.34-98.96%) is significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of PS (2.62-6.48%), due to the fact that this compound has the highest solubility in mixed micellar aqueous phase (Armstrong and Carey, 1987; Hamada et al, 2006; Matsuoka et al, 2008 and 2010; Goncalves et al, 2011). If mixed matrixes are considered (FbMa and FbMb), a decrease in soluble cholesterol is observed when the bioaccessible PS content is higher (FbMb), as previously reported (Goncalves et al, 2011). These authors found the addition of phytosterols ( $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol) to taurodeoxycholate mixed micelles to induce a decrease in cholesterol incorporation, probably due to dynamic molecular competition.

Different studies involving absorption in a validated model of intestinal epithelium (Caco-2 cells) (Fahy, O'Callaghan and O'Brien, 2004; Ito, Ohtsubo, Kusu and Hakamata, 2012), animals (Bhattacharyya, 1981; Igel, Giesa, Lütjohann and Von Bergmann, 2003) and humans (Heinemann, Axtmann and Von Bergmann, 1993; Lütjohann, Bjorkhem, Beil and Von Bergmann, 1995; Miettinen, Vuoristo, Nissinen, Järvinen and Gylling, 2000; Ostlund et al, 2002) have been reported a sterol absorption trend in agreement to the bioaccessibility values observed for individual sterols in our simulated gastrointestinal digestion model, where cholesterol > campesterol  $\geq$  campestanol >  $\beta$ -sitosterol  $\approx$  sitostanol  $\approx$

stigmasterol. In addition, it is important to mention that, to our knowledge, this is the first time that the effect of gastrointestinal digestion upon sterol solubility has been reported in enriched foods.

### **3.2 Sterol oxidation products**

Table 2 reports the SOPs content ( $\mu\text{g}/100$  g of beverage) and their relative abundance.  $7\alpha$ -hydroxy(OH)sitosterol,  $7\beta$ -OHSitosterol, sitostanetriol (triol),  $\beta$ -epoxysitosterol ( $\beta$ -epoxy),  $\alpha$ -epoxysitosterol ( $\alpha$ -epoxy), 7-keto(k)sitosterol,  $7\alpha$ -OHcholesterol,  $7\beta$ -OHcholesterol and 7-kcholesterol were detected (except for  $\alpha$ -epoxy and 7-kcholesterol in FbMb and Fb, respectively). Such identification is in agreement with a previous study (Alemany-Costa et al, 2012) in which  $\beta$ -sitosterol oxides were the only oxysterols detected in similar beverages, since  $\beta$ -sitosterol was the most abundant PS.

**Table 2:** Sterol oxidation products content in analyzed beverages and bioaccessible fraction (BF) expressed in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  beverage (relative percentage to total POPs or COPs content is indicated in parenthesis).

	FbM <sub>a</sub>			FbM <sub>b</sub>			M			Fb		
	BEVERAGE	BF	BA	BEVERAGE	BF	BA	BEVERAGE	BF	BA	BEVERAGE	BF	BA
<b><math>\beta</math>-SITOSTEROL OXIDES (POPs)</b>												
7 $\alpha$ -OH	8.86 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup> (13.85 $\pm$ 3.05)	4.50 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup> (13.81 $\pm$ 1.26)	50.81 $\pm$ 6.29 <sup>z,w</sup>	7.08 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup> (12.41 $\pm$ 1.58)	3.16 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup> (11.60 $\pm$ 1.07)	44.66 $\pm$ 1.96 <sup>ab,w</sup>	8.21 $\pm$ 1.12 <sup>ab</sup> (8.44 $\pm$ 0.68)	3.16 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup> (16.97 $\pm$ 0.70)	38.51 $\pm$ 5.31 <sup>b,w</sup>	9.38 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup> (13.63 $\pm$ 0.57)	4.29 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup> (13.09 $\pm$ 0.75)	45.68 $\pm$ 3.90 <sup>ab,w</sup>
7 $\beta$ -OH	13.44 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup> (21.28 $\pm$ 6.48)	8.21 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup> (25.17 $\pm$ 4.12)	61.08 $\pm$ 11.66 <sup>z,w</sup>	12.77 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup> (22.24 $\pm$ 0.69)	4.74 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup> (17.37 $\pm$ 1.29)	37.09 $\pm$ 0.92 <sup>b,x</sup>	12.81 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup> (13.04 $\pm$ 1.04)	4.47 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup> (23.93 $\pm$ 0.77)	34.94 $\pm$ 5.85 <sup>b,w</sup>	12.79 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup> (18.57 $\pm$ 2.75)	6.90 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup> (21.05 $\pm$ 0.68)	53.98 $\pm$ 5.36 <sup>z,w</sup>
$\beta$ -epoxy	11.62 $\pm$ 0.78 <sup>ab</sup> (15.44 $\pm$ 1.47)	-	-	4.62 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup> (7.98 $\pm$ 0.73)	-	-	15.24 $\pm$ 3.32 <sup>a</sup> (15.49 $\pm$ 1.37)	-	-	11.12 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup> (16.15 $\pm$ 1.39)	-	-
$\alpha$ -epoxy	11.02 $\pm$ 0.93 <sup>ab</sup> (14.61 $\pm$ 0.83)	-	-	-	-	-	16.74 $\pm$ 3.80 <sup>a</sup> (16.98 $\pm$ 1.19)	-	-	6.51 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup> (9.57 $\pm$ 1.10)	-	-
triol	11.37 $\pm$ 3.51 <sup>a</sup> (17.29 $\pm$ 3.68)	10.39 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup> (32.12 $\pm$ 5.49)	91.36 $\pm$ 10.92 <sup>z,x</sup>	16.08 $\pm$ 2.22 <sup>b</sup> (27.89 $\pm$ 1.41)	12.12 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup> (44.23 $\pm$ 2.56)	75.39 $\pm$ 8.40 <sup>ab,y</sup>	17.64 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup> (18.38 $\pm$ 3.30)	11.06 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup> (59.10 $\pm$ 1.36)	62.68 $\pm$ 10.76 <sup>b,x</sup>	8.94 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup> (12.99 $\pm$ 2.20)	15.80 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup> (48.09 $\pm$ 1.52)	176.63 $\pm$ 21.29 <sup>c,x</sup>
7k	17.53 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup> (27.54 $\pm$ 6.97)	9.57 $\pm$ 2.80 <sup>a</sup> (28.91 $\pm$ 5.41)	54.63 $\pm$ 15.98 <sup>z,w</sup>	16.98 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup> (29.48 $\pm$ 0.73)	7.33 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup> (26.81 $\pm$ 0.22)	43.17 $\pm$ 2.06 <sup>ab,w,x</sup>	27.37 $\pm$ 8.26 <sup>b</sup> (27.67 $\pm$ 4.27)	-	-	22.21 $\pm$ 1.38 <sup>ab</sup> (32.27 $\pm$ 1.18)	5.84 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup> (17.78 $\pm$ 0.10)	26.27 $\pm$ 2.61 <sup>b,y</sup>
<b>Total POPs</b>	73.83 $\pm$ 15.77 <sup>a</sup>	32.67 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup>	49.29 $\pm$ 5.72 <sup>a</sup>	57.52 $\pm$ 5.70 <sup>a</sup>	27.35 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	47.54 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>	98.00 $\pm$ 4.97 <sup>b</sup>	18.70 $\pm$ 3.05 <sup>b</sup>	19.08 $\pm$ 3.11 <sup>b</sup>	70.95 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>	32.82 $\pm$ 3.41 <sup>a</sup>	47.72 $\pm$ 4.95 <sup>a</sup>
<b>CHOLESTEROL OXIDES (COPs)</b>												
7 $\alpha$ -OH	44.10 $\pm$ 3.56 <sup>a</sup> (21.95 $\pm$ 0.61)	1.73 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup> (40.57 $\pm$ 10.83)	3.91 $\pm$ 0.69 <sup>ab,y</sup>	36.25 $\pm$ 2.94 <sup>b</sup> (17.01 $\pm$ 1.85)	-	-	26.34 $\pm$ 2.16 <sup>c</sup> (27.18 $\pm$ 1.84)	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> (2.57 $\pm$ 0.06)	0.58 $\pm$ 0.05 <sup>ab,y</sup>	3.60 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup> (34.75 $\pm$ 1.35)	0.42 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup> (17.78 $\pm$ 6.45)	11.58 $\pm$ 3.12 <sup>b,y</sup>
7 $\beta$ -OH	57.26 $\pm$ 7.13 <sup>a</sup> (28.53 $\pm$ 3.27)	3.88 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup> (63.10 $\pm$ 12.19)	6.78 $\pm$ 1.40 <sup>ab,y</sup>	52.40 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup> (24.56 $\pm$ 1.30)	4.62 $\pm$ 1.25 <sup>ac</sup> (100)	9.85 $\pm$ 1.09 <sup>z,x</sup>	35.25 $\pm$ 2.48 <sup>b</sup> (36.36 $\pm$ 1.10)	6.66 $\pm$ 1.64 <sup>c</sup> (97.43 $\pm$ 0.06)	18.90 $\pm$ 4.65 <sup>b,z</sup>	6.76 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup> (65.25 $\pm$ 1.35)	1.40 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup> (79.08 $\pm$ 6.75)	20.66 $\pm$ 3.01 <sup>b,y</sup>
7k	99.47 $\pm$ 10.67 <sup>a</sup> (49.52 $\pm$ 3.86)	-	-	125.01 $\pm$ 11.18 <sup>b</sup> (58.44 $\pm$ 3.11)	-	-	35.31 $\pm$ 1.65 <sup>c</sup> (36.46 $\pm$ 0.96)	-	-	-	-	-
<b>Total COPs</b>	200.83 $\pm$ 14.13 <sup>a</sup>	5.61 $\pm$ 1.20 <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	213.67 $\pm$ 7.91 <sup>a</sup>	4.62 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	96.90 $\pm$ 4.97 <sup>b</sup>	6.82 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	6.09 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	10.36 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>	1.81 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	17.01 $\pm$ 11.03 <sup>c</sup>

Different superscript letters denote significant differences ( $p < 0.05$ ) in the same compound and in the same kind of sample (beverage or BF or BA, within lines) (a-d) or in the BA of the same sample (FbM<sub>a</sub>, FbM<sub>b</sub>, M, Fb, within columns) (w-z). FbM<sub>a</sub>: Fruit (with tangerine) and milk based beverage with PS; FbM<sub>b</sub>: Fruit (without tangerine) and milk based beverage with PS; M: Milk with PS; Fb: Fruit beverage (with tangerine) with PS. BF: Bioaccessible fraction; BA: percentage of bioaccessibility (calculated as (PS content in BF\*100)/(PS content in beverage)).

Total POPs content in beverages ranged between 57.52 and 98.00  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  of beverage, the milk sample being the one with the highest quantity of POPs; this can be ascribed to the absence of natural antioxidants from fruit juices. In similar beverages prepared at laboratory scale, POPs varied between 580 and 830  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  of beverage (Alemany-Costa et al, 2012). Such differences can be explained because beverages manufactured at industrial scale (present results) have a reduced oxidation stage. In general, 7-ksitosterol was the most abundant oxide in all samples. In beverages containing tangerine juice from concentrate (Fb, FbMa), 7 $\beta$ -OHsitosterol was the second most representative oxide, followed by  $\beta$ -epoxy, whereas in beverages without tangerine juice from concentrate (FbMb, M), the second most important oxide was triol. Total amounts of COPs ranged between 10.36 and 213.67  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  of beverage, Fb being the lowest one. In all beverages, 7-kcholesterol was the most abundant derivative, except for Fb, where it was not detected. In addition, 7 $\beta$ -OH derivative content was always higher than 7 $\alpha$ -OH, showing a preferential formation of this isomer (for  $\beta$ -sitosterol and cholesterol), because it has been previously reported that the  $\beta$  epimer is more stable from a thermodynamic standpoint (Smith, 1996).

Table 3 reports the sterol oxidation ratios in the samples, which ranged between 0.012% and 0.017% for  $\beta$ -sitosterol. These percentages are lower than those previously reported for similar beverages (0.07%) prepared at laboratory scale (Alemany-Costa et al, 2012) and in phytosterol-enriched milk products (0.04-0.09%) (Soupas, Huikko and Lampi, 2006; Menéndez-Carreño, Ansorena and Astiasarán, 2008). Cholesterol displayed higher oxidation ratios than  $\beta$ -sitosterol (Table 3),



varying from 6.3-14.9%. These results are also higher than those obtained by Menéndez-Carreño et al. (2008) (0.39%) in phytosterol-enriched low-fat milk. However, our samples contained lower cholesterol amounts (0.17-2 mg/100 g of beverage) than the previous study (Menéndez-Carreño et al, 2008) (17.6 mg/100 g of milk) – this explaining that the COPs/cholesterol ratio is easily increased.

**Table 3:** Oxidation rate of  $\beta$ -sitosterol and cholesterol in beverages calculated as [(total oxides content/100 g beverage)/(total sterol content/100 g beverages)] \* 100.

<b>OXIDATION RATE</b>				
	FbM <sub>a</sub>	FbM <sub>b</sub>	M	Fb
$\beta$ -Sitosterol	$0.013 \pm 0.003^{ab}$	$0.012 \pm 0.001^a$	$0.017 \pm 0.003^b$	$0.013 \pm 0.000^{ab}$
Cholesterol	$14.857 \pm 1.045^a$	$10.682 \pm 0.396^b$	$6.404 \pm 0.329^c$	$6.283 \pm 0.168^c$

Different superscript letters (a-c) denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples. FbM<sub>a</sub>: Fruit (with tangerine) and milk based beverage with PS; FbM<sub>b</sub>: Fruit (without tangerine) and milk based beverage with PS; M: Milk with PS; Fb: Fruit beverage (with tangerine) with PS.

Table 2 reports the SOPs contents in BF samples, which were lower than those of the corresponding beverages. In contrast to beverages, epoxy-derivatives of  $\beta$ -sitosterol and 7-k-derivative of cholesterol were not detected, in the same way as  $7\alpha$ -OHcholesterol and 7-k-sitosterol in FbM<sub>b</sub> and in milk beverage (M), respectively. Total POPs content ranged between 18.70 and 32.82  $\mu$ g/100 g of beverage. The bioaccessible amount

obtained after simulated gastrointestinal digestion ( $\approx 0.79 \mu\text{M}$ ) is far from being deleterious for health if compared to cytotoxic values in cell cultures ( $60\text{-}120 \mu\text{M}$ ) (Ryan et al, 2009).

Regarding individual POPs, triol was the most abundant oxide, whereas the profile/abundance of the other oxides varied according to the type of sample. COPs contents in BF ranged between 1.81 and 6.82  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  of beverage. As in the beverages,  $7\beta\text{-OH}$ -derivative (of both  $\beta$ -sitosterol and cholesterol) was higher than  $7\alpha$ - isomer in BF; however, the difference between both  $7\alpha\text{-OH}$  and  $7\beta\text{-OH}$  in BF samples was smaller. The absence of epoxy derivatives of  $\beta$ -sitosterol in all the BF samples could be explained by their inter-conversion into triol compounds, as previously described for COPs in aqueous acid medium of gastric juice (Maerker, Nungesser and Bunik, 1988). This same behavior has been observed in lymph lipids of rats, where epoxides were partially transformed in their corresponding triols (Grandgirard, Sergiel, Nour, Demaison-Meloche and Giniès, 1999).

Table 2 also shows the bioaccessibility values of SOPs. Total POPs bioaccessibility ranged between 19.08 and 49.29%, the bioaccessibility of M sample being the lowest ( $p < 0.05$ ) (as in the case of PS). Bioaccessibility of POPs was higher than that of PS, which agrees with the absorption trends observed in mice (Tomoyori et al, 2004). Regarding individual POPs, triol was the most bioaccessible oxide in all samples, being higher than 100% in Fb, probably due to the aforementioned inter-conversion of epoxy-derivatives into triol. In samples with tangerine juice (FbMa and Fb),  $7\beta\text{-OH}$  sitosterol bioaccessibility was higher than the corresponding  $\alpha$ -derivative; in contrast,  $7\alpha\text{-OH}$  sitosterol was the prevalent

epimer in samples without tangerine juice (FbMb and M), which is an unusual behavior for this oxide. Total COPs bioaccessibility ranged between 2.16-17.01%. As has been previously reported (Otaegui-Arrazola, Menéndez-Carreño, Ansorena and Astiasarán, 2010), the absorption of COPs is lower than that of cholesterol. Although bioaccessibility of total COPs in Fb was statistically ( $p < 0.05$ ) higher than that of the other samples studied, total COPs were the lowest before (beverage) and after digestion (BF). Moreover, in all the samples,  $7\beta$ -OHcholesterol bioaccessibility was higher than for the corresponding  $\alpha$ -isomer.

To the best of our knowledge, there are no previous reports on the effect of simulated gastrointestinal digestion on the SOPs contents in whole foods or in model mixed micelles. Overall, triols were higher than hydroxy- and ketoderivatives, and  $7\beta$ -OH  $>$   $7\alpha$ -OH, for POPs and COPs bioaccessibility, respectively. In contrast to what was observed for sterols, where a similar trend can be established with the *in vivo* situation, for SOPs this extrapolation is not always possible. In this sense, each absorbed SOP has been reported to be metabolized differently within the rat, thus reaching different concentrations in tissues (Bang, Arakawa, Takada, Sato and Imaizumi, 2008); this may be due to the fact that SOPs can have a dietary origin, or can be formed *in vivo* by non-enzymatic oxidation or auto-oxidation of the parent compound or by enzymatic processes involving cytochrome P450 enzymes (Ryan et al, 2009).

#### **4. Conclusions**

The enrichment of mixed beverages containing fruit juices and milk seems to be the best option for obtaining the highest bioaccessibility of plant sterols. In *in vitro* assays carried out, the exclusion of tangerine juice in the formulation of beverages of this kind would be better for this purpose.

Higher bioaccessibility of POPs than PS was observed, suggesting different patterns of solubility for these compounds into mixed micelles. However, the amounts of POPs quantified in the bioaccessible fraction are not potentially cytotoxic, thus guaranteeing the safety of the intake of these beverages.

Studies of bioaccessibility, as a prior step for further absorption, could be considered a predictive model of the rate of absorption of sterols/stanols from whole foods, due to their similarity with *in vitro* and *in vivo* absorptive models. However, in the case of sterol oxides, extrapolation to the *in vivo* situation is difficult to establish, since *in vivo* oxides formation can occur. Therefore, more studies are needed to identify and quantify sterol oxides in micelles after a simulated digestion process.

#### **Acknowledgements**

We thank Hero España, S.A. for providing the samples. This study was financed by AGL2008-02591-C02-01 (CICYT-FEDER) and partially funded by Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063. The authors from the University of Valencia are participants in the FA1005 COST Action

INFOGEST on food digestion. Laia Alemany holds a grant from the Generalitat Valenciana (Spain).

## **References**

Alemany-Costa, L., González-Larena, M., García-Llatas, G., Alegría, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L.M., & Lagarda, M.J. (2012). Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. *Food Research International*, 48, 265-270.

Armstrong, M.J., & Carey, M.C. (1987). Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *Journal of Lipid Research*, 28, 1144-1155.

Baldi, A., & Pinotti, L. (2008). Lipophilic microconstituents of milk. *Bioactive Components of Milk*, 606, 109-125.

Bang, H.J., Arakawa, C., Takada, M., Sato, M., & Imaizumi, K. (2008). A comparison of the potential unfavourable effects of oxysterol and oxyphytosterol in mice: different effects on cerebral 24S-hydroxycholesterol and serum. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 72, 3128-3133.

Bhattacharyya, A.,K. (1981). Uptake and esterification of plant sterols by rat small intestine. *The American Journal of Physiology*, 240, G50-G55.

Bohn, T., Tian, Q., Chitchumroonchokchai, C., Failla, M.L., Schwartz, S.J., Cotter, R., & Waksman, J.A. (2007). Supplementation of test meals with fat-free phytosterol products can reduce cholesterol

micellarization during simulated digestion and cholesterol accumulation by Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 267-272.

Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28, 217-225.

Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Cumella, F., Sardi, L., Della Casa, G., & Lercker, G. (2011). Oxidative stability of pork meat lipids as related to high-oleic sunflower oil and vitamin E diet supplementation and storage conditions, *Meat Science*, 88, 271-279.

Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Baldacci, E., Savioli, S., & Lercker, G. (2012). Analysis of cholesterol oxidation products by Fast gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 35, 424-430.

European Commission Decision 2004/335 of 31 March 2004 authorising the placing on the market of milk type products and yoghurt type products with added phytosterol esters as novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of European Communities*, 2004, L105, 46-47.

Devaraj, S., Autret, B., & Jialal, I. (2006). Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 756-761.

Fahy, D.M., O'Callaghan, Y.C., & O'Brien, N.M. (2004). Phytosterols: lack of cytotoxicity uptake in Caco-2 cells in culture. *Food Additives and Contaminants*, 21, 42-51.

Fernandez-García, E., Carvajar-Lerida, I., & Perez-Galvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760.

García-Llatas, G., & Rodríguez-Estrada, M.T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 607-624.

Goncalves, A., Gleize, B., Bott, R., Nowicki, M., Amiot, M-J., Lairon, D., Borel, P., & Reboul, E. (2011). Phytosterols can impair vitamin D intestinal absorption in vitro and in mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, S303-S311.

González-Larena, M., Garcia-Llatas, G., Vidal, M.C., Sanchez-Siles, L.M., Barbera, R., & Lagarda, M.J. (2011). Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3624–3631.

González-Larena, M., Cilla, A., García-Llatas, G., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2012). Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4725–4734.

Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., & Blázquez-García, S. (2007). In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 102, 641-648.

Granado-Lorencio F., Donoso-Navarro, E., Sánchez-Siles, L.M., Blanco-Navarro, I., & Pérez-Sacristán, B. (2011). Bioavailability of  $\beta$ -cryptoxanthin in the presence of phytosterols: In vitro and in vivo studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11819-11824.

Grandgirard, A., Sergiel, J., Nour, M., Demaison-Meloche, J., & Giniès, C. (1999). Lymphatic Absorption of Phytosterol Oxides in Rats. *Lipids*, 34, 563-570.

Hamada, T., Goto, H., Yamahira, T., Sugawara, T., Imaizumi, K., & Ikeda, I. (2006). Solubility in and affinity for the bile salt micelle of plant sterols are important determinants of their intestinal absorption in rats. *Lipids*, 41, 551-555.

Heinemann, T., Axtmann, G., & Von Bergman, K. (1993). Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *European Journal of Clinical Investigation*, 23, 827-831.

Igel, M., Giesa, U., Lütjohann, D., & Von Bergmann, K. (2003). Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *Journal of Lipid Research*, 44, 533-538.

Ikeda, I., Tanaka, M., Sugano, M., Vahouny, G.V., & Gallo, L.L. (1988). Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *Journal of Lipids Research*, 29, 1573-1582.

Ito, N., Ohtsubo, T., Kusu, F., & Hakamata, H. (2012). An ultra performance liquid chromatographic method for determining phytosterol uptake by Caco-2 cells. *Analytical Biochemistry*, 421, 86-91.

Lütjohann, D., Bjorkhem, I., Beil, U.F., & Von Bergmann, K. (1995). Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: Effect of sitostanol treatment. *Journal of Lipid Research*, 36, 1763-1773.

Maerker, G., Nungesser, E.H., & Bunick, F.J. (1988). Reaction of cholesterol 5,6-epoxides with simulated gastric juice. *Lipids*, 23, 761-765.



Malaki Nik, A., Corredig, M., & Wright, A.J. (2011). Release of lipophilic molecules during in vitro digestion of soy protein-stabilized emulsions. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, S278-S289.

Matsuoka, K., Nakazawa, T., Nakamura, A., Honda, C., Endo, K., & Tsukada, M. (2008). Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterols and stanol in bile salt micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 154, 87-93.

Matsuoka, K., Kajimoto, E., Horiuchi, M., Honda, C., & Endo, K. (2010). Competitive solubilization of cholesterol and six species of sterol/stanol in bile salt micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163, 397-402.

Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2008). Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9997-10002.

Miettinen, T.A., Vuoristo, M., Nissinen, M., Järvinen, H.J., & Gylling, H. (2000). Serum, biliary and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1095-1102.

Ostlund, R.E., McGill, J.B., Zeng, C., Covey, D.F., Stearns, J., Stenson, W.F., & Spilburg, C.A. (2002). Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy  $\Delta^5$ -phytosterols and phytostanols in humans. *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism*, 282, E911-E916.

Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I., 2010. Oxysterols: a world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3289–3303.

Rideout, T.C., Chan, Y., Harding, S.V., & Jones P.J.H. (2009). Low and moderate-fat plant sterol fortified soymilk in modulation of plasma lipids and cholesterol kinetics in subjects with normal to high cholesterol concentrations: report on two randomized crossover studies. *Lipids in Health and Disease*, 8, 45-51.

Ryan, E., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., & O'Brien, N.M. (2009). Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Reviews International*, 25, 157-174.

Saraiva, D., Castilho, M.C., Martins, M.R., Noronha da Silveira, M.I., & Ramos, F. (2011). Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 4, 28-34.

Soupas, L., Huikko, L., & Lampi, A.M. (2006). Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, 222, 266-273.

Tomoyori, H., Kawata, Y., Higuchi, T., Ichi, I., Sato, H., Sato, M., Ikeda, I., & Imaizumi, K., (2004). Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice. *Journal of Nutrition*, 134, 1690-1696.

**BLOQUE II. EFECTOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* DE  
LOS ÓXIDOS DE ESTEROLES.**



*5. Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells*

**Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and  
7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells**

Alemaný L<sup>a</sup>, Laparra JM<sup>b</sup>, Barberá R<sup>a</sup>, Alegría A<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Nutrition and Food Chemistry. Faculty of Pharmacy,  
University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100  
Burjassot. Spain.

<sup>b</sup>Agrochemistry and Food Technology Institute. National Research  
Council. Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna. Spain.

**Keywords:** *Plant sterol oxidation products; Caco-2 cells; cytotoxic effects; 7k-stigmasterol; 7k-cholesterol.*

**Abbreviations:** *1,2,3-Dihydrodihydrorhodamine (DHR), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), Cholesterol oxidation products (COPs), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), Plant sterol oxidation products (POPs), Phosphate buffered solution (PBS), Propidium iodide (PI).*

**Highlights:** *7k-stigmasterol did not cause deleterious effects in Caco-2 cells. The sub-cellular target of 7k-cholesterol toxicity seems to be the mitochondria. 7k-stigmasterol demonstrated a capacity to reduce toxic effects of 7k-cholesterol.*

## **ABSTRACT**

The biological implications of cholesterol oxidation products have been investigated, though research on plant sterol oxidation products is scarce and in some cases contradictory.

The cytotoxicity of 7keto(k)-stigmasterol versus 7keto(k)-cholesterol at different concentrations (0-120 $\mu$ M) and incubation times (4-24h), in intestinal epithelial cells (Caco-2 cells) was evaluated. The 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide and neutral red uptake tests, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), and relative DNA and RNA contents in the cell cycle phases were determined. Possible interaction effects between 7k-derivatives or non-oxidized stigmasterol were monitored.

Endo/lysosomal activity was not impaired by either oxide. 7k-cholesterol showed a deleterious effect upon the mitochondrial compartment after 24h of exposure (120  $\mu$ M), as well as upon  $\Delta\Psi_m$  when incubated at all concentrations (12/24h). Only cells incubated with 7k-cholesterol (120  $\mu$ M) exhibited a decrease in RNA proportion in the G1 population. The presence of 7k-stigmasterol or stigmasterol with 7k-cholesterol reduced the deleterious metabolic effects upon mitochondrial functionality and integrity and the distribution of RNA contents in G1 and G2 phases. A decrease in the G1 phase proportion was detected in cells exposed to mixtures, without alterations in RNA content. The results obtained indicate the absence of 7k-stigmasterol cytotoxicity in Caco-2 cells and its capacity to reduce 7k-cholesterol toxicity.



## **1. Introduction**

Due to their known cholesterol-lowering effect, plant sterols are used in nutritional strategies to prevent coronary and cardiovascular risks (Garcia-Llatas and Rodriguez-Estrada, 2011).

The structure of plant sterols is similar to that of cholesterol and, consequently, they are prone to oxidation during technological processes in food production and/or storage, leading to the formation of plant sterols oxidation products (POPs) with potential cytotoxic effects. There is evidence that cholesterol oxidation products (COPs) may be linked to the initiation and progression of several chronic diseases including atherosclerosis, neurodegenerative processes, diabetes, kidney failure and ethanol intoxication (Otaegui-Arrazola et al., 2010). However, research on biological activities of POPs has been more limited, and the results in some cases have been contradictory (reviewed by Hovenkamp et al., 2008, Ryan et al., 2009, Garcia-Llatas and Rodriguez-Estrada, 2011).

Previous studies have demonstrated qualitatively similar cytotoxic effects of POPs in different mammalian cell types, with differences in their susceptibility. Cholesterol oxidation products exert severe cytotoxic effects in the liver and favor the development of cardiovascular diseases - the intestinal epithelium being the first physiological barrier after the oral intake of these compounds. Adcox et al., (2001), in a cultured mouse macrophage cell line (C57BL/6) exposed to cholesterol oxides and oxides of  $\beta$ -sitosterol/campesterol mixture (200  $\mu\text{g/mL}$ ), reported similar patterns of toxicity in the form of reduced cell viability and mitochondrial dehydrogenase activity. However, the effects were less severe with the plant sterol oxides. The same conclusion was drawn by Maguire et al.

(2003) in monocytic-U937 cells, after evaluating the cytotoxic effects of  $\alpha$ -epoxysitosterol and a  $\beta$ -sitosterol thermooxidized mixture versus  $7\beta$ -OH-cholesterol. Koschutnig et al. (2009), in hepatic-HepG2 cells, reported a decrease in cell viability when exposed to  $\beta$ -sitosterol oxides, but only  $7k$ -sitosterol ( $30\ \mu\text{M}$ ) induced apoptosis. Other studies have evaluated the cytotoxicity and apoptotic potential of individual  $\beta$ -sitosterol oxides applied to three cell lines: human monocytic line (U937), hepatoma (HepG2) and colonic adenocarcinoma (Caco-2), establishing comparisons with their corresponding COPs.  $7\beta$ -OH, 7-keto and triol derivatives of  $\beta$ -sitosterol were found to be cytotoxic (at  $60$  and  $120\ \mu\text{M}$ ) for all the cell lines (in contrast to COPs, which were toxic even at  $30\ \mu\text{M}$ ), but no evidence of apoptosis was found in either HepG2 or Caco-2 cells (Ryan et al., 2005). The mechanism by which  $7\beta$ -OH derivatives of cholesterol and  $\beta$ -sitosterol may cause cell death in Caco-2 cells has been analyzed in more detail by Roussi et al. (2005), revealing more sensitive responses to  $7\beta$ -OH cholesterol than to  $7\beta$ -OH sitosterol. Both hydroxysterols ( $30\ \mu\text{M}$  and  $60\ \mu\text{M}$ , respectively) reduced cell proliferation and induced apoptosis by intracellular caspase-dependent process for  $7\beta$ -OH-sitosterol, and various caspase-independent factors for  $7\beta$ -OH-cholesterol. Roussi et al. (2007) evaluated and compared the  $7\beta$ -OH-sitosterol and  $7\beta$ -OH-cholesterol effects upon mitochondrial and lysosomal integrity and several apoptosis modulators. Both compounds caused mitochondrial membrane perturbations in an early stage of the apoptotic process (12h) after treatment. In addition, lysosomal membrane integrity was altered by both hydroxysterols, whereas  $7\beta$ -OH-sitosterol was found to be more potent than its corresponding oxysterol.

Most of these studies reported negative effects of these compounds upon the energetic or lysosomal metabolism of the different cell cultures, sometimes associated to the appearance of apoptosis processes. However, because of their greater prevalence and also due to the lack of commercially available pure plant sterol oxides, most cytotoxicity studies have focused on  $\beta$ -sitosterol oxides.

$\beta$ -Sitosterol, campesterol and stigmasterol are the most prevalent plant sterol in terms of dietetic intake. The average intake of plant sterols, and in particular of stigmasterol, has been estimated by several authors in different population groups (Morton et al., 1995, Vries et al., 1997, Jekel et al., 1998, Normén et al., 2001, Valsta et al., 2004). Moreover, the greater uptake efficiency of stigmasterol versus  $\beta$ -sitosterol has been demonstrated in Caco-2 cells (10 to 40 times greater, depending on the concentration involved) (1.6-12.5  $\mu$ M) (Fahy et al., 2004).

Only one study has been found on the inhibitory effect of synthesized stigmasterol oxides ( $\alpha$ -epoxide,  $\beta$ -epoxide, 7-keto, 7 $\beta$ -OH, epoxydiol, diepoxide, 22*R*,23*R*-triol and 3,5,6-triol) related to the cytotoxicity and apoptotic effects upon the U937 monocytic cell line (O'Callaghan et al., 2010). These authors evaluated the viability and the mitochondrial functionality of these cells (30-120  $\mu$ M) as well as the percentage of apoptotic nuclei (30-120  $\mu$ M) and other indices of cell death (60  $\mu$ M) - including glutathione depletion, caspase-3 activity and Bcl-2 expression levels - showing these compounds to cause different toxicities depending on their structure. In this study, they observed no decrease in cellular activity, though a decrease in mitochondrial functionality was recorded with 7k-stigmasterol (30-120  $\mu$ M), without inducing apoptosis. In

contrast, 7k-sitosterol was significantly ( $p < 0.05$ ) cytotoxic and apoptotic in this cell line (Ryan et al., 2005) and in HepG2 cells (Koschutnig et al., 2009), as previously reported.

In view of the above observations, the present study was designed to evaluate the potential cytotoxicity of 7k-stigmasterol versus 7k-cholesterol in the endo/lysosomal and mitochondrial compartments, as well as the proportion of acid nuclei in intestinal epithelial cells (Caco-2 cells). Since both compounds can coexist in food, an evaluation was made of the possible effect of 7k-cholesterol in the presence of 7k-stigmasterol or stigmasterol, with evaluation of the aforementioned parameters.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Chemicals**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM + GlutaMAX™), glucose, fetal bovine serum, non-essential amino acids, HEPES, antibiotic solution (penicillin–streptomycin), fungizone, phosphate buffered solution (PBS) and trypsin-EDTA solution (2.5g/L trypsin and 0.2g/L EDTA) were purchased from Gibco (Scotland, UK). Ethanol 99.9%, HCl 37% were from Merck (Darmstadt, Germany). 7k-stigmasterol was from Steraloids (Newport, RI, USA). Stigmasterol, 7k-cholesterol, Neutral Red dye, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), triton, 1,2,3-dirhodamine (DHR), propidium iodide (PI), RNase A, trisodium citrate, Hoechst 33342 and pyronin Y were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and 2-propanol 99.9% was from Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, France).

## **2.2 Caco-2 cell culture**

After oral intake, the intestinal epithelium constitutes the first physiological barrier for the absorption of POPs. It is therefore interesting to study the effects of these compounds using a validated intestinal epithelial cell model (Caco-2 cells), since data in this field remain scarce. Cell cultures were used 6 days post-seeding. Cell differentiation in this cell line was assessed and confirmed by measuring brush border enzyme activities (alkaline phosphatase and sucrase-isomaltase), according to the procedure described by Jovani et al. (2001).

Human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC 86010202, Salisbury, UK) and were used between passages 42 and 60. They were grown in 75 cm<sup>2</sup> Falcon flasks (IWAKI brand) in DMEM + GlutaMAX™ containing 1 g/L glucose and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) non-essential amino acids, 1% (v/v) HEPES, 1% (v/v) antibiotic solution (penicillin–streptomycin) and 0.2% (v/v) fungizone. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>.

For all experiments, cells were sub-cultured after trypsin treatment (2.5 g/L trypsin and 0.2 g/L EDTA) and seeded onto 24-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> with 1 mL of DMEM. Culture media were changed every two days.

## **2.3 Caco-2 treatment with 7-keto sterols**

In order to compare the cytotoxicity of 7k-stigmasterol and 7k-cholesterol, both oxides were dissolved in ethanol and used at a final concentration of 30, 60 or 120 µM in DMEM (containing 0.66% (v/v) of

ethanol). One milliliter of these solutions was added to cell cultures and incubated for different times (4, 12 and 24 h).

In order to evaluate the possible effect of 7k-cholesterol in the presence of 7k-stigmasterol or stigmasterol, cell cultures were challenged to 1 mL of different solutions of stigmasterol, 7k-stigmasterol or 7k-cholesterol alone (120  $\mu$ M), or to mixtures of 7k-cholesterol with stigmasterol or 7k-stigmasterol (120  $\mu$ M each) in DMEM (containing 0.66% (v/v) of ethanol) for 24h.

In both assays, control cultures were exposed to DMEM containing an equivalent volume of ethanol (0.66% (v/v)).

#### **2.4 Evaluation of endo/lysosomal activities**

Following the aforementioned treatments, the supernatants were removed from the cell cultures and aliquots (1 mL) of Neutral Red dye (1/10 (v/v) in PBS) were added to each well. The plate was returned to the incubator and kept for 1h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> to allow for uptake of the red dye into the endo/lysosomal compartment (Borenfreud and Puerner, 1987) of viable cells. Then, the medium was removed and the red dye was redissolved with 1.5 mL of 1% glacial acetic acid/50% ethanol. After homogenization on a plate shaker, the samples were transferred to microcuvettes and absorbance was determined spectrophotometrically (540 nm with background subtraction at 570 nm).

#### **2.5 Evaluation of mitochondrial functionality**

The mitochondrial functionality of the Caco-2 cells was evaluated by using the MTT assay (Laparra et al., 2008). This colorimetric method is

based on reduction of the tetrazolium ring of MTT by mitochondrial dehydrogenases (Ekmekcioglu et al., 1999), yielding a blue formazan product that is proportional to the number of viable cells and can be measured spectrophotometrically. Briefly, after incubation with the sterol oxides the culture medium was removed, MTT (0.5 mg/mL in PBS) was added to the cells, followed by incubation for 1 h at 37 °C/5% CO<sub>2</sub>/95% relative humidity atmosphere. Then, the medium was removed and cells were harvested with 1.5 mL of a solution of acidic 2-propanol (0.1N HCl, 0.1% w/v triton). The conversion to formazan was measured using a spectrophotometer and absorbance was measured at 570 nm with background subtraction at 690 nm.

## 2.6 Mitochondrial membrane ( $\Delta\Psi_m$ ) collapse

Changes in  $\Delta\Psi_m$  were evaluated using DHR (5  $\mu$ M) and PI double labeling as described elsewhere (Cilla et al., 2008, Laparra et al., 2008). Briefly, after exposure to the compounds, cultures were incubated with 300  $\mu$ L of PBS containing DHR for 15 min in the dark. Afterwards, 300  $\mu$ L of a PI staining solution (1 mg/mL of trisodium citrate, 0.05 mg/mL of PI and 1 mg/mL of RNase A) was added with an additional incubation time of 15 min. Cells were then resuspended and fluorescent intensities of DHR ( $\lambda_{exc} = 488$  nm and  $\lambda_{em} = 525$  nm) and PI ( $\lambda_{exc} = 488$  nm and  $\lambda_{em} = 620$  nm) were quantified by flow cytometry (Coulter, EPICS XL-MCL, Miami, FL, USA).

Changes in  $\Delta\Psi_m$  were estimated by the relative amount of PI versus DHR double negative cells. At least 10,000 cells per sample were analyzed.

## **2.7 Cell cycle analysis and relative RNA content in Caco-2 cells**

Cell cycle analysis was performed by PI staining of DNA content in exposed cultures as described elsewhere (Laparra et al., 2008, Cilla et al., 2011), with slight modifications. Briefly, cells were resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (1 mg/mL of trisodium citrate, 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  of sodium dodecyl sulphate (0.5% w/v), 0.05 mg/mL PI and 1 mg/mL of RNase A). After incubation during 2h at 4°C, the released nuclei were resuspended by agitation with a Pasteur pipette and the fluorescence was analyzed by flow cytometry (Coulter, EPICS XL-MCL, USA) at  $\lambda_{\text{exc}} = 536 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$ . Unspiked control cells were used throughout each assay.

To evaluate relative RNA distribution in cell cycle phases, simultaneous Hoechst 33342 and pyronin Y staining was performed according to the protocol described by Darzynkiewicz (1994), with some modifications. Briefly, cells were harvested and resuspended with a solution of PBS:ethanol (1:1, v/v) for 2 min. After fixation, cells were centrifuged (1200 rpm/5 min) and resuspended again in 0.5 mL of PBS containing Hoescht 33342 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) during 10 min at room temperature. Afterwards, 0.5 mL of PBS containing pyronin Y (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added and incubated for 10 min at room temperature.

Cell suspensions were analyzed on a Modular Flow Cytometer Cell Sorter (MoFlo Sorter, Dakocytomation, USA). Hoechst was excited with the UV line of an argon laser ( $\lambda_{\text{exc}}$ : 346 nm -  $\lambda_{\text{em}}$ : 460 nm) and Pyronin Y was excited at  $\lambda_{\text{exc}}$ : 555 nm, and the fluorescence collected at  $\lambda_{\text{em}}$ : 580 nm.



## **2.8 Statistical analysis**

One-factor (concentration) analysis of variance (ANOVA) and the LSD test were applied to determine differences in cytotoxic effects between treated and control cultures. A significance level of  $p < 0.05$  was adopted for all comparisons. Statgraphics Plus version 5.0 (Rockville, Maryland, USA) was used for the statistical analysis.

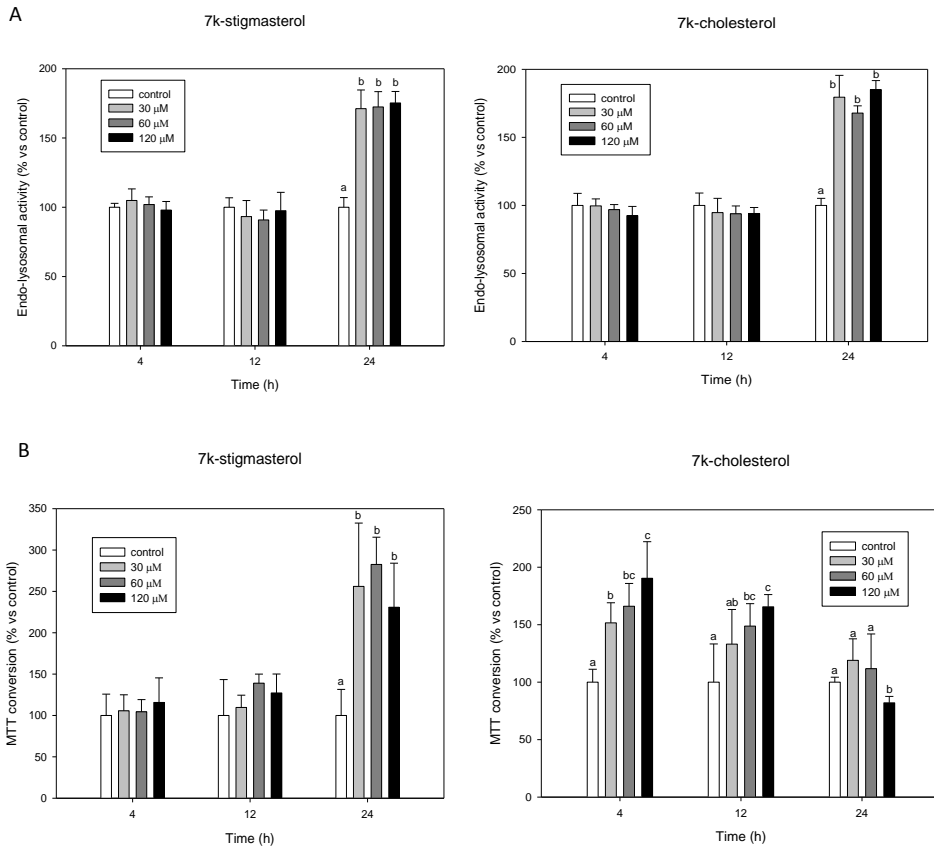
## **3. Results and discussion**

### **3.1 7k-sterols-induced changes in endo/lysosomal and mitochondrial functionality**

In order to locate the preferential subcellular target of 7k-sterols-induced cytotoxicity, the dose-dependent effects of 7k-stigmasterol and 7k-cholesterol upon lysosomal and mitochondrial functionality have been evaluated in Figure 1A and B, respectively.

Cultured cells exposed to either 7k-stigmasterol or 7k-cholesterol showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the activity of the endo/lysosomal compartment versus control, at all concentration tested after 24h of incubation. However, this finding cannot be interpreted as a deleterious effect in this sub-cellular compartment since Neutral Red dye penetrates cell membranes by nonionic passive diffusion and concentrates only in the lysosomes of viable cells (Repetto et al., 2008) (see Figure 1A).

**Figure 1:** Lysosomal enzyme activity (A) and mitochondrial functionality (B) of Caco-2 cells exposed to different concentrations (30, 60 and 120  $\mu\text{M}$ ) of 7k-stigmasterol and 7k-cholesterol for different incubation periods (4, 12 and 24h).



Data are expressed as the mean standard deviation of 6 replicates. Different superscript letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

In the case of mitochondrial functionality, 7k-stigmasterol, at shorter incubation times (4-12h) and for all the concentrations tested exhibited no differences versus the controls. However, the response recorded after 24h of exposure cannot be interpreted as a deleterious effect upon the cell culture (Figure 1B). In contrast, different patterns emerged in cell cultures exposed to 7k-cholesterol, showing that this compound is not deleterious for the cell cultures at shorter incubation times (4, 12h), at any of the tested concentrations. A statistically significant decrease ( $p < 0.05$ ) is observed in mitochondrial functionality after 24h of incubation (120  $\mu\text{M}$ ), compared to the control response. The negative effect of 7k-cholesterol in MTT conversion values, associated to 24h of exposure to a concentration of 120  $\mu\text{M}$  could be interpreted as a cytotoxic effect upon the cell mitochondrial compartment.

7k/7 $\beta$ -OH-sitosterol (60 and 120  $\mu\text{M}$ ) have proved to be cytotoxic for intestinal epithelial cells (Caco-2 cells), causing disturbances in lysosomal activities (Neutral Red dye test) that resulted in a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in cell viability (64.4% and 61.9%, respectively, for 60  $\mu\text{M}$  for 24h, and 23.3% and 40.8%, respectively, for 120  $\mu\text{M}$  for 24 h), without evidence of apoptosis (Ryan et al., 2005). Comparing with their corresponding COPs, 7k/7 $\beta$ -OH-cholesterol (30  $\mu\text{M}$ ) caused a reduction in cell viability of 82.9% and 88.8%, respectively. This observation is not consistent with the findings in our study, and since the same concentrations and exposure times were used, such differences can only be attributed to the culture conditions involved, and which were not specified by the mentioned authors.

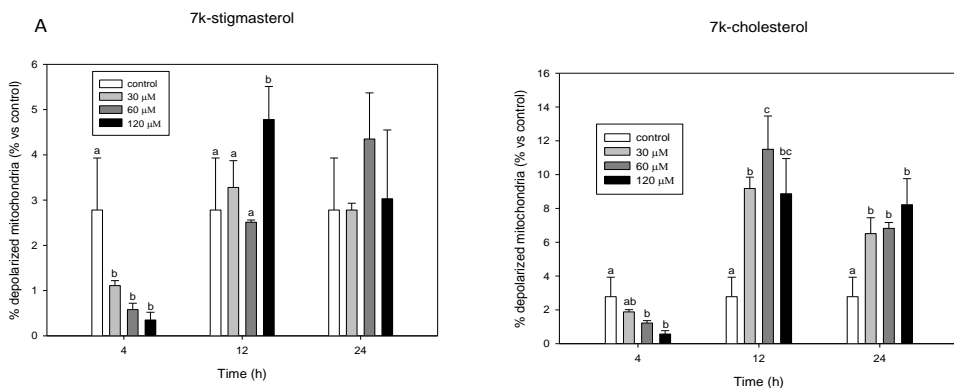
Roussi et al. (2007) demonstrated that 7 $\beta$ -OH-sitosterol (60  $\mu$ M) caused 15% and 5% greater destabilization of the lysosomal compartment than 7 $\beta$ -OH cholesterol (30  $\mu$ M) after incubation for 12 and 24h, respectively, evidencing the cellular adaptation response. These authors attributed lysosomal alterations to the potential insertion of both sterol oxides into the phospholipid double layers of the lysosomal and mitochondrial compartments, as described elsewhere (Awad et al., 1996; Roussi et al., 2007). In U937, O'Callaghan et al. (2010) reported that 7k-stigmasterol did not induce cell death versus control cells when incubated for 24h at concentrations of up to 120  $\mu$ M with fluorescein diacetate and ethidium bromide staining assay. However, this oxide reduced the mitochondrial functionality (50%) of these cells even at the lowest concentration used (30  $\mu$ M), as determined by the MTT test. These results taken together suggest that differences in sterol oxide structures, cell lines and in the sensitivity of the applied test could condition their cytotoxicity.

### **3.2 Alterations in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), cell cycle progression and relative content of RNA**

Mitochondrial integrity prevents organelle dysfunction and the release of pro-apoptotic factors (Shimizu et al., 2004). Changes in permeabilization of the inner mitochondrial membrane were determined in Caco-2 cell cultures exposed to 7k-stigmasterol (Figure 2A) and 7k-cholesterol (Figure 2B). Cell cultures exposed to 7k-stigmasterol only showed a significant ( $p < 0.05$ ) loss of  $\Delta\Psi_m$  (4.8%) after 12h of incubation at the 120  $\mu$ M concentration, without impairment after longer

incubation times. In contrast, 7k-cholesterol exposure caused significant ( $p < 0.05$ ) losses of  $\Delta\Psi_m$  after 12h (9.2%, 11.5% and, 8.9% for 30, 60, 120  $\mu\text{M}$ , respectively) and 24h (6.5%, 6.8% and 8.2%, respectively) versus the controls. Cell cultures exposed to concentrations of 30-60  $\mu\text{M}$  of 7k-cholesterol can significantly ( $p < 0.05$ ) recover mitochondrial functionality when incubated for up to 24h versus 12h, but not those incubated with concentrations of 120  $\mu\text{M}$ . These results are in accordance with other authors (Roussi et al., 2007).

**Figure 2.** Changes in the permeabilization of inner mitochondrial membrane in Caco-2 cells after exposure to different concentrations (30, 60, 120  $\mu\text{M}$ ) of 7k-stigmasterol (A) or 7k-cholesterol (B), and different incubation periods (4, 12, 24 h).



Data are expressed as the mean standard deviation of 3 replicates. Different superscript letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

Mitochondrial membrane permeabilization has been previously indicated as an important determinant in hydroxysterol-mediated apoptosis in intestinal cells (Roussi et al., 2007) and human monocytic U937 cells (Maguire et al., 2003; Ryan et al., 2005). The negative effects observed in intestinal cells were associated to greater losses of  $\Delta\Psi_m$  caused by 30  $\mu\text{M}$  of 7 $\beta$ -OH cholesterol (60% and 20% for 12h and 24h, respectively) versus 60  $\mu\text{M}$  of 7 $\beta$ -OH sitosterol (45% and 18%, respectively) (Roussi et al., 2007), which is concordant with the effects described in the present study for 7k-cholesterol. Of note is the observation that cell cultures incubated with 7k-stigmasterol exhibited smaller losses of  $\Delta\Psi_m$  than those values (45%) indicated by Roussi et al. (2007) for 60  $\mu\text{M}$  of 7 $\beta$ -OH sitosterol. These data suggest differences in POPs cytotoxicity as a function of the structure considered, and which could be mediated by differences on their internalization and accumulation rates.

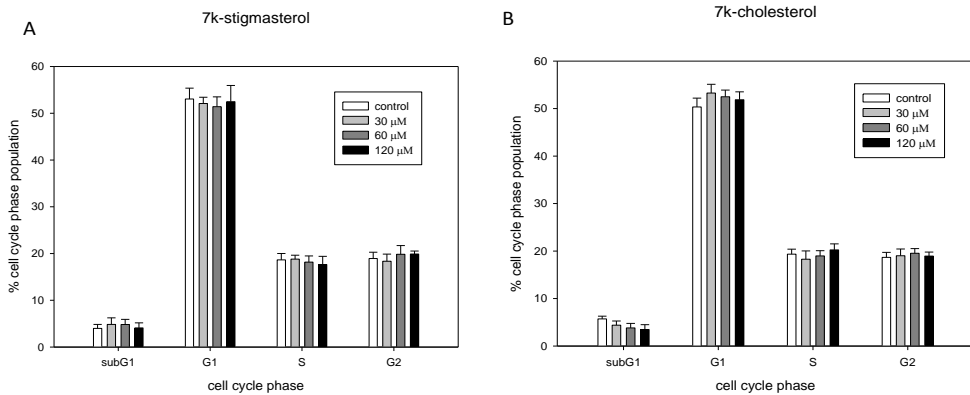
It has been reported that COPs can regulate cell functions through modifications of the biophysical properties of cell membranes (Lordan et al., 2009), and given the structural similarity between POPs and COPs, it could be postulated that this observation is also applicable to POPs. Moreover, studies indicate that the biophysical effects of oxysterols in membrane model systems are governed by their structure, and these membrane effects may be correlated to other biological effects including apoptosis (Massey et al., 2006).

In the case of the stigmasterol oxides, the only study on the inhibitory effect of stigmasterol oxides upon the proliferation of U937 cells (O'Callaghan et al., 2010) showed that depending on their structure, these compounds cause different toxicities.

The results of previous research indicate the existence of different apoptotic mechanisms involving caspase-9 and/or -3 for 7 $\beta$ -OH sitosterol and 7 $\beta$ -OH cholesterol (Roussi et al., 2005). This observation points to the mitochondrial compartment as a key target of POPs cytotoxicity. However, the differential negative effects observed as a function of the chemical structures considered suggests the appearance of cytotoxic effects as a consequence of metabolic failures. Whether these effects are directly mediated by metabolic enzymes or caused by the impairment of mitochondrial membranes, adversely affecting cell homeostasis, remains unclear. Most research supports the conclusion that oxysterols, predominantly found in oxidized low-density lipoproteins, exert pathological effects through the induction of apoptotic cell death (Lordan et al., 2009). The latter has been strongly implicated in the pathogenesis of atherosclerosis as well as in a variety of other diseases. The 7k-cholesterol data referred to  $\Delta\Psi_m$  are not conclusive for confirming cell apoptosis, though they can provide insights to the implication of apoptosis processes because alterations in mitochondrial permeability constitute a preliminary stage inhibiting cell growth and development and inducing apoptosis. In this study, neither exposure to 7k-stigmasterol (Figure 3A) nor to 7k-cholesterol (Figure 3B) led to increases in the sub-G1 phase population, suggesting the absence of apoptotic signaling. Moreover, there were no significant changes in any of the other cell cycle phase populations. This cell behavior is concordant with the absence of changes in cell cycle phase populations of cultures exposed (for up to 32 h) to 7 $\beta$ -OH sitosterol (60  $\mu$ M) and 7 $\beta$ -OH cholesterol (30  $\mu$ M) (Roussi et al., 2005). However, these authors indicated much earlier (after 12h) 7 $\beta$ -OH sitosterol-induced but

not 7 $\beta$ -OH cholesterol-induced sharp increases in caspase-3 activity in intestinal epithelial cells (Caco-2 cells) that were not reflected in higher sub-G1 cell phase populations after an incubation period of up to 48h.

**Figure 3:** Changes in cell cycle phase populations of Caco-2 cultures exposed to different concentrations (30, 60, 120 $\mu$ M) of 7k-stigmasterol (A) or 7k-cholesterol (B) during 24h.



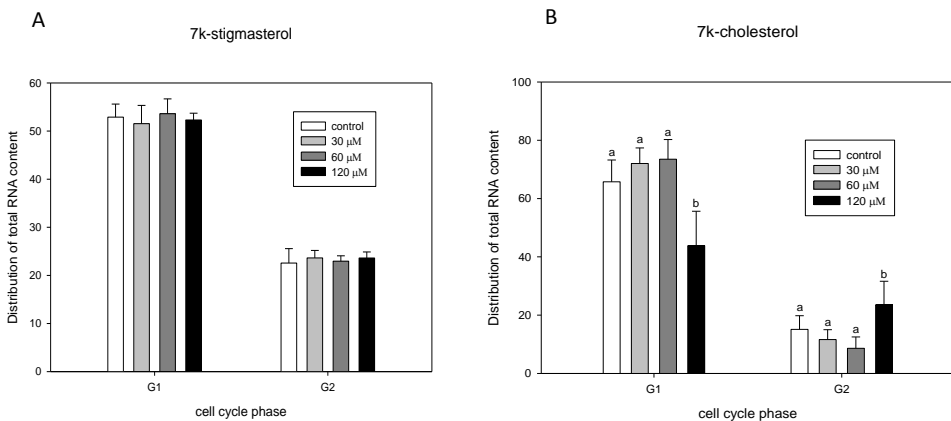
Data are expressed as the mean standard deviation of 4 replicates. No significant differences were detected ( $p > 0.05$ ).

To explore further changes in cell biology, we quantified the relative distribution of total RNA content in G1 and G2 cell cycle phase populations. While cell cultures exposed to 7k-stigmasterol (Figure 4A), at any of the concentrations used, did not show significant changes in G1 and G2 phase populations, those cultures incubated with 7k-cholesterol (Figure 4B) (30-60  $\mu$ M) showed an increasing ( $p > 0.05$ ) trend for total RNA in the G1 phase population. Accordingly, these changes were associated to a decreasing trend ( $p > 0.05$ ) of total RNA content in the G2



population. On the other hand, the opposite trend was observed when cell cultures were exposed to 120  $\mu\text{M}$  of 7k-cholesterol, where total RNA content in the G1 population was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the values found even in control cultures – this reflecting the negative effects of this compound upon the main functional cell population, impairing protein synthesis.

**Figure 4:** Distribution of total RNA content in cultured Caco-2 cells incubated with different concentrations (30, 60, 120 $\mu\text{M}$ ) of 7k-stigmasterol (A) or 7k-cholesterol (B) for 24h.



Data are expressed as the mean standard deviation of 5 replicates. Different superscript letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

Ryan et al. (2005) investigated intestinal epithelial cell death when exposed to different sitosterol oxides (30-120  $\mu\text{M}$ ), either alone or in the form of thermooxidized mixtures, and concluded that these compounds did not cause apoptosis but necrosis in Caco-2 cultures, in good agreement

with the results obtained in our study. This behavior is in concordance with the increased susceptibility of metabolic activities in mammalian cells (Caco-2, HepG2 and U937) to COPs, compared to POPs, as previously reported (Maguire et al., 2003; Ryan et al., 2005). Concerning the cytotoxicity of stigmasterol oxides, O'Callaghan et al., 2010, in U937 monocytic cells, only observed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in apoptotic nuclei in cultured cells exposed to 30-120  $\mu\text{M}$  of epoxydiol, and 7 $\beta$ OH and diepoxide derivatives of stigmasterol during 24h. In contrast to Ryan et al. (2005), these authors did not find any evidence of apoptosis for the 7k derivative of stigmasterol. They attributed the different cytotoxic manifestations of 7k- and  $\beta$ -epoxide derivatives of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol to structural differences among them.

### **3.3 Effect of 7k-stigmasterol on 7k-cholesterol-mediated toxicity in Caco-2 cells**

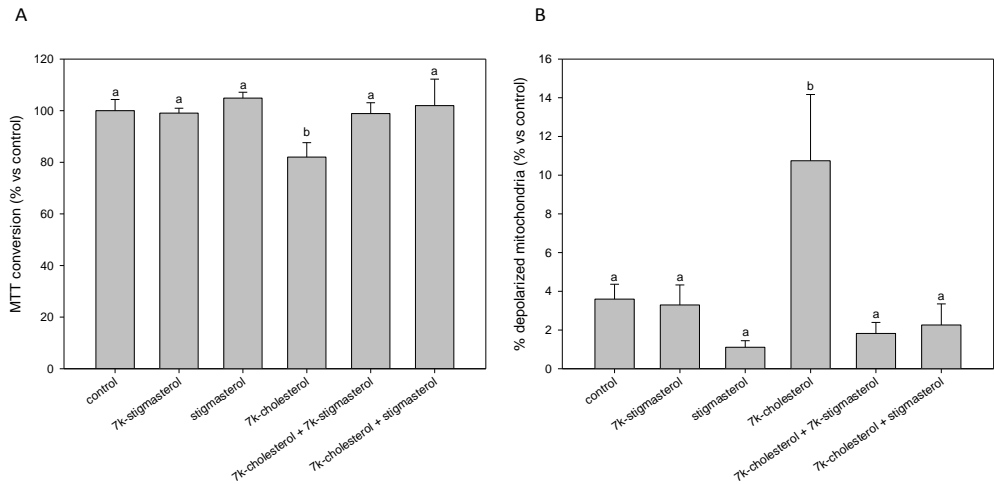
Since both studied compounds can coexist in food (as well as non-oxidized plant sterols), it is interesting to evaluate the possible interactions between them. We determined the potential synergic effects at 120  $\mu\text{M}$ , since at this concentration we recorded the most marked effects of the studied compounds.

Metabolic changes in the mitochondrial functionality of Caco-2 cell cultures using the MTT conversion assay (Figure 5A) indicate the positive effect of stigmasterol or 7k-stigmasterol, inhibiting the cytotoxic effect of 7k-cholesterol, when present simultaneously. Concordant with mitochondrial functionality were the data concerning  $\Delta\psi\text{m}$ , which showed the more preserved ( $p < 0.05$ ) mitochondrial potential in cultures exposed

to mixtures of both 7k-derivatives from stigmasterol and cholesterol versus 7k-cholesterol alone (Figure 5B). However, cell cycle analyses indicate that mixtures composed of stigmasterol and 7k-cholesterol or 7k-stigmasterol and 7k-cholesterol had similar effects upon cell cycle progression. We detected a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the G1 phase cell population, with the subsequent increase in the G2 phase population (Figure 6), but only in the case of the 7k-derivatives mixture was there a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the S phase population, with no simultaneous increase in the sub-G1 population (associated with an apoptotic cell death process). Based on the positive effects observed in the metabolic activities and  $\Delta\Psi_m$  in the cell cultures exposed to stigmasterol or 7k-stigmasterol with 7k-cholesterol, these mixtures show a protective effect versus the significant changes ( $p < 0.05$ ) of 7k-cholesterol alone in the distribution of total RNA content in the G1 and G2 cycle phase populations.

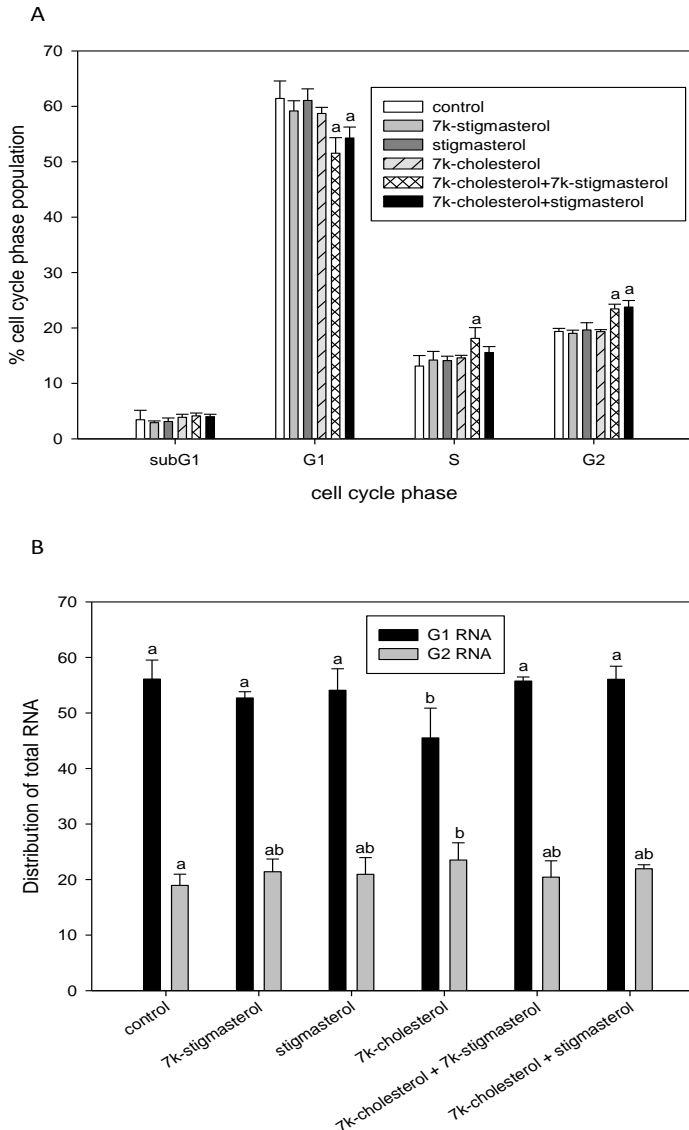
The results obtained after exposing intestinal cell cultures to the studied mixtures clearly indicate similar interaction of stigmasterol or 7k-stigmasterol with a final positive effect reducing 7k-cholesterol toxicity.

**Figure 5:** Metabolic changes in mitochondrial functionality (A) and in permeabilization of the inner mitochondrial membrane (B) of Caco-2 cells after exposure to different compounds or mixtures of the studied oxides (120  $\mu$ M each) for 24h.



Data are expressed as the mean standard deviation of 6 replicates. Different superscript letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

**Figure 6:** Changes in cell cycle phase populations (A) and relative RNA content (B) in Caco-2 cell cultures exposed to different compounds or mixtures for 24h.



Data are expressed as the mean standard deviation of 5 replicates. Different superscript letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

#### **4. Conclusions**

In summary, 7k-stigmasterol at the concentration range used (30-120  $\mu\text{M}$ ) did not impair metabolic functionality in the endo/lysosomal and mitochondrial compartments or induce changes in the proportion of nucleic acids (DNA or RNA) in Caco-2 cell cultures. On the other hand, the negative effects caused by 7k-cholesterol after 12h of incubation seemed to constitute a mitochondrial pathway without affecting the endo/lysosomal compartment. In addition, 7k-cholesterol altered the relative total RNA distribution in the G1 and G2 cycle phases, but without increases in the sub-G1 cycle phase. To conciliate the previously reported 7k-cholesterol-mediated induction of apoptosis with the data presented in this study, we can hypothesize that earlier metabolic alteration of mitochondrial functionality can be progressively aggravated, impairing mitochondrial integrity that ultimately triggers apoptosis signaling.

The presence of stigmasterol or 7k-stigmasterol together with 7k-cholesterol reduced the cytotoxic effects caused by 7k-cholesterol. The different toxicity pattern when both compounds are present opens a new view in order to elucidate possible differences among transport mechanisms or metabolic pathways of these compounds.

#### **Acknowledgements**

This study was financially supported by project AGL2008-02591-C02-01 (CICYT-FEDER) and partially funded by Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063. Thanks are due to the SCIE from the University of Valencia for its assistant support. Laia Alemany-Costa holds a grant from the Generalitat Valenciana (Spain).

**References**

Acdox, C., Boyd, L., Oehrl, L., Allen, J., Fenner, G., 2001. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *J Agric Food Chem*, 49, 2090-2095.

Awad, A.B., Chen, Y.C., Fink, C.S., 1996. Beta-sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Res*, 16, 2797-2804.

Cilla, A., Laparra, J.M., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., 2008. Antioxidant effect derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chem*, 106, 1180-1187.

Cilla Tatay, A., Laparra, J.M., Alegria, A., Barbera, R., 2011. Mineral and/or milk supplementation of fruit beverages helps in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Nutr Hosp*, 26, 614-621.

Darzynkiewicz, Z., 1994. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content. *Method cell biol*, 41, 401-420.

Ekmekcioglu, C., Strauss-Blasche, G., Leibetseder, V.J., 1999. Toxicological and biochemical effects of different beverages on human intestinal cells. *Food Res Int*, 32, 421-427.

Fahy, D.M., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, N.M., 2004. Phytosterols: lack of cytotoxicity but interference with  $\beta$ -carotene uptake in Caco-2 cells in culture. *Food Additives and Contaminants*, 21, 42-51.

Garcia-Llatas, G., Rodriguez-Estrada, M.T., 2011. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem and Phys Lip*, 164, 607-624.

Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., 2008. Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progr Lipid Res*, 47, 37-49.

Jekel, A.A., Vaessen, H.A.M.G., Schothorst, R.C., 1998. Capillary gas-chromatographic method for determining non-derivatized sterols – some results for duplicate 24h diet samples collected in 1994. *Fresenius J Anal Chem*, 360, 595-600.

Jovaní, M., Barberá, R., Farré, R., Martín de Aguilera, E., 2001. Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 49, 3480-3485.

Koschutnig, K., Heikkinen, S., Kemmo, S., Lampi, A.M., Piironen, K., Wagner H., 2009. Cytotoxic and apoptotic effects of single and mixed oxides of  $\beta$ -sitosterol on HepG2-cells. *Toxicol in Vitro*, 23, 755-762.

Laparra, J.M., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., 2008. Antioxidant effect of casein phosphopeptides compared with fruit beverages supplemented with skimmed milk against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Res Int*, 41, 773-779.

Lordan, S., Mackrill, J.J., O'Brien, N.M., 2009. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J Nutr Biochem*, 20, 321-336.

Maguire, L., Konoplyannikov, M., Ford, A., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2003. Comparison of the cytotoxic effects of  $\beta$ -sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7 $\beta$ -hydroxyxholesterol, in cultured mammalian cells. *Brit J Nutr*, 90, 767-775.



Morton, G.M., Lee, S.M., Buss, D.H., Lawrance, P., 1995. Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet. *J Hum Nutr Diet*, 6, 429-440.

Normén, L., Brants, H.A.M., Voorrips, L.E., Andersson, H.A., van den Brandt, P., 2001. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr*, 74, 141-148.

O'Callaghan, Y., Foley, D.A., O'Connell, N.M., McCarthy, F., Maguire A.R., O'Brien N.M., 2010. Cytotoxic and apoptotic effects of the oxidized derivatives of stigmasterol in the U937 human monocytic cell line. *J Agr Food Chem*, 58, 10793-10798.

Otaegui-Arrazola, A., Menendez-Carreño, M., Ansorena, D., 2010. Oxysterols: A world to explore. *Food Chem Toxicol*, 48, 3289-3303.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, R., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, 3, 1125-1131.

Roussi, S., Winter, A., Gosse, F., Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F., 2005. Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7 $\beta$ -hydroxysitosterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ*, 12, 128-135.

Roussi, S., Gossé, F., Aoudé-Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F., 2007. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7 $\beta$ -hydroxysitosterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, 12, 87- 96.

Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2005. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxicity and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Brit J Nutr*, 94, 443-451.

Ryan, E., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2009. Phytosterol oxidation products: Their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev Int*, 25, 157-174.

Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., Tsujimoto, Y., 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6, 1221-1228.

Valsta, L.M., Lemström, A., Ovaskainen, M.-L., Lampi, A.-M., Toivo, J., Korhanen, T., Piironen, V., 2004. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *Brit J Nutr*, 92, 671-678.

Vries, J.H.M., Jansen, A., Kromhout, D., van de Bovenkamp, P., van Staveren, W.A., Mensink, R.P., Katan, M.B., 1997. The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged in seven countries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 115-141.

*6. Relative expression of cholesterol transport-related proteins  
and inflammation markers through the induction of  
7-ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells*

**Relative expression of cholesterol transport-related proteins  
and inflammation markers through the induction of 7-  
ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells**

L. Alemany<sup>a</sup>, J.M. Laparra<sup>b</sup>, R. Barberá<sup>a</sup>, A. Alegría<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Nutrition and Food Chemistry. Faculty of Pharmacy, University of Valencia,  
Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Valencia). Spain.

<sup>b</sup>Institute of Agrochemistry and Food Technology. National Research Council.  
Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna (Valencia). Spain.

**Keywords:** Oxysterols, 7-ketostigmasterol, 7-ketocholesterol, inflammation, cholesterol metabolism.

### **Abbreviations**

ABCG5/8: ATP binding cassette proteins (G5/8), ACAT: acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, [Ca]<sub>i</sub>: intracellular calcium, COPs: cholesterol oxidation products, DHR: 1,2,3-dihydrorhodamine, DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ER: endoplasmic reticulum, FBS: fetal bovine serum, HMG-CoA reductase: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, IL: interleukin, LDL: low-density lipoprotein, LXR: liver X receptor, MCP-1: monocyte chemotactic protein 1, NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1, PI: propidium iodide, POPs: phytosterols oxidation products, PS: plant sterols, rt-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, SREBP: sterol regulatory element-binding protein, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ .

### **Highlights**

7-ketostigmasterol have a greater proinflammatory potential than 7-ketocholesterol. 7-ketostigmasterol-mediated alterations in cholesterol metabolism are mediated by changes in intracellular calcium levels.

7-ketosterol-induced changes in gene expression of enzymes related to cholesterol metabolism

### **Abstract**

Human diets contain sterol oxidation products that can induce cytotoxic effects, mainly caused by cholesterol oxides. However, phytosterol oxides effects have been less extensively investigated. This study evaluates the production of inflammatory biomarkers (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ) and the influence of gene expression transporters and enzymes related to cholesterol absorption and metabolism (NPC1L1, ABCG5/8, HMGCoA, ACAT) produced by 7-ketosterols (stigmasterol/cholesterol) in Caco-2 cells. These effects were linked to intracellular signaling pathways by using several inhibitors. Results showed 7-ketostigmasterol to have a greater proinflammatory potential than 7-ketocholesterol. In non-pre-treated cells, only efflux transporters were down-regulated by 7-ketosterols, showing a greater influence upon ABCG5 expression. Cell-pre-incubation with bradykinin induced changes in ABCG expression levels after 7-ketostigmasterol-incubation; however, the energetic metabolism inhibition reduced NPC1L1 expression only in 7-ketocholesterol-incubated cells. In non-pre-treated cells, HMG-CoA was up-regulated by both 7-ketosterols. However, exposure to inhibitors down-regulated the expression levels, mainly in 7-ketocholesterol-incubated cells. While ACAT expression values in non-pre-treated cells were unchanged, exposure to inhibitors caused down-regulation of mRNA levels. These results suggest that internalization and excretion of 7-ketostigmasterol is probably influenced by [Ca]<sub>i</sub>, which also could mediate HMGCoA activity in POPs metabolism. However, energetic metabolism and reducing equivalents exert different influences upon the 7-ketosterol internalization.

## **1. Introduction**

Plant sterols (PS) have been used for the enrichment of several foods mainly due to their blood cholesterol-lowering effect, thereby contributing to reduce cardiovascular risk (García-Llatas and Rodríguez-Estrada, 2011). Other beneficial properties have also been associated to PS, such as antiinflammatory effects (Othman and Moghadasian, 2010).

Plant sterols can undergo oxidation similarly to cholesterol because of structural similarities in their chemical structures, giving rise to phytosterol oxidation products (POPs). A previous work by our group has demonstrated that 7-ketostigmasterol did not induce cytotoxic effects in intestinal epithelial (Caco-2) cells, and inhibited 7-ketocholesterol cytotoxicity in cultured intestinal cells when both compounds were present in the culture media (Alemany et al., 2012). These data are in good agreement with the lesser susceptibility to cytotoxic effects caused by POPs in liver (HepG2) cells (Koschutnig et al., 2009) or Caco-2 cells, monocytic (U937) cells and HepG2 cells (Ryan et al., 2005) - suggesting that 7-ketostigmasterol could reduce the intracellular accumulation of 7-ketocholesterol. From the limited data available, it is currently not possible to speculate about which specific mechanism or mechanisms underlie this influence.

At intestinal epithelial level, the Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) transporter facilitates cholesterol transport into the intestinal mucosa (Hui and Howles, 2005, Sudhop et al., 2005), with the suggested additional participation of passive diffusion processes in relation to cholesterol absorption. Intracellular accumulation of cholesterol results from the

coordinated action of influx and efflux (ABCG5- and 8-) transporters to the lumen, though esterification (ACAT) processes are also involved, modifying the proportion of cholesterol in nascent chylomicrons that reach the bloodstream (Ryan et al., 2009).

Previous studies have shown that COPs regulate key enzymes in cholesterol metabolism similarly to non-oxidized cholesterol (Brown and Jessup, 2009, Otaegui-Arrazola et al., 2010). These studies have demonstrated the COPs-mediated increase in HMG-CoA reductase degradation and cholesterol efflux via ABC transporters (Brown and Jessup, 2009). To the best of our knowledge, only one study has evaluated the interaction of different mixtures of POPs, derived from  $\beta$ -sitosterol or stigmasterol, in the expression of enzymes in cholesterol metabolism in hamsters, showing their down-regulatory effect upon the expression of hepatic sterol regulatory element-binding protein (SREBP), LDL reductase activity, and ABCG5 transporter at the intestinal epithelium (Liang et al., 2011). These data likely indicate that POPs could inhibit enzymes in cholesterol metabolism in the liver and its intestinal efflux.

On the other hand, previous research has attributed a pro-apoptotic potential involving mitochondrial disturbances for 7 $\beta$ -OH sitosterol in Caco-2 cells (Roussi et al., 2005). In accordance with this effect, 7-ketostigmasterol (120  $\mu$ M) also caused alterations in mitochondrial membrane potential in intestinal cells (Alemany et al., 2012). Increased concentrations of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  have been reported during stages preceding apoptosis (Lizard et al., 1997), and can have important consequences for intestinal integrity. In addition, different COPs display



potent regulatory effects upon inflammatory cytokine and chemokine production in Caco-2 cells (Mascia et al., 2010). On the other hand, COPs *in vitro* have also been shown to up-regulate the expression of growth factors (TGF- $\beta$ 1) (Leonarduzzi et al., 2001) associated with inflammatory bowel diseases (Mascia et al., 2010) and atherosclerotic plaque development (Otaegui-Arrazola et al., 2010). Only one study has evaluated the inflammatory potential of POPs (7 $\beta$ -hydroxysterol or 7-ketosterol) in relation to monocytic cells, indicating the absence of inflammatory potential as concluded from the no significant production of proinflammatory mediators such as monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and IL-8 (Vejux et al., 2012). However, these authors reported significant 7-ketosterol-mediated production of IL-8.

Despite direct association of these processes to epithelial cells, data concerning the influence of POPs on development of those are lacking. Accordingly, the objectives of the present study were: 1) to evaluate the proinflammatory potential of 7-ketostigmaterol in comparison to 7-ketocholesterol; and 2) to monitor changes in expression (mRNA) levels of key enzymes in cholesterol absorption and metabolism in intestinal epithelial (Caco-2) cell cultures and evaluate whether their influence can be associated to different intracellular transduction pathways.

## 2. Material and methods

**2.1 Cell culture.** Human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC 86010202, Salisbury, UK) and used between passages 63 and 70. Cells

were grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks (Falcon) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 1g/L glucose and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1% (v/v) non-essential amino acids (Gibco), 1% (v/v) HEPES, 1% (v/v) antibiotic solution (penicillin–streptomycin) (Biowhittaker), and 0.2% (v/v) fungizone (Gibco). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>.

For all experiments, cells were trypsinized (0.5% trypsin/2.6 mM EDTA) and seeded onto 24-well plates at an initial density of 5 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> with 1 mL of DMEM. The experiment was performed at 5 days post-seeding. Culture media were changed every two days.

**2.2 Pre-treatment of cell cultures.** Prior to exposure to 7-ketosterols, Caco-2 cell cultures were incubated (15 minutes/37 °C) or not incubated with several compounds: a) bradykinin (5 μM), an activator of sphingolipid metabolism that plays an important role in the regulation of fluid and electrolyte balance; b) rotenone (5 μM), an inhibitor of mitochondrial electron transport; or c) oligomycin (1 μM), an inhibitor of membrane bound mitochondrial ATP synthase. The concentrations of these inhibitors were selected in order to not exert a toxic effect upon the cell cultures, and were based on previous studies (Laparra and Sanz, 2010).

**2.3 Incubation with 7-ketosterols.** 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol were dissolved in ethanol (0.66%) and were added to the cells to a final concentration of 60 μM, and incubated for 3 hours. Control cells were exposed to culture media with the same concentration of

ethanol. These experimental conditions were chosen taking into account data from previous studies in which the cytotoxic effects of these compounds were evaluated (Alemany et al., 2012). Two independent assays were performed.

**2.4 Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ).** Changes in  $\Delta\Psi_m$  were evaluated using 1,2,3-dihydrorhodamine (DHR) and propidium iodide (PI) double labeling, as previously described (Cilla et al., 2008). Briefly, after exposure to the compounds (inhibitors and/or 7-ketosterols), cell cultures were incubated with 300  $\mu$ L of PBS containing DHR (5  $\mu$ M) for 15 min. in the dark. Afterwards, 300  $\mu$ L of a PI staining solution (1 mg/mL of trisodium citrate, 0.05 mg/mL of PI and 1 mg/mL of RNase A) was added, followed by an additional incubation time of 15 min. Fluorescent intensities of DHR ( $\lambda_{exc} = 488$  nm and  $\lambda_{em} = 525$  nm) and PI ( $\lambda_{exc} = 488$  nm and  $\lambda_{em} = 620$  nm) were measured by flow cytometry (Coulter, EPICS XL-MCL, Miami, FL, USA). At least 10,000 cells per sample were analyzed.

**2.5 Relative gene expression analyses.** After 3 hours of treatment with 7-ketosterols, total RNA was extracted from Caco-2 cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the instructions of the manufacturer. One hundred nanograms of total RNA were converted to double-stranded cDNA using AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA).

Polymerase chain reaction (PCR) was carried out with primers designed for the different human genes (**Table 1**). PCR was carried out in

a total volume of 20  $\mu\text{L}$  consisting of 2.5  $\mu\text{L}$  of cDNA, 7.5  $\mu\text{L}$  of Sybr Green buffer (as fluorophor) (Sigma) and 0.5  $\mu\text{L}$  of each primer, and in 20  $\mu\text{L}$  with RNase-free water. The PCR program consisted of one denaturation cycle at 95°C for 5 min., 40 amplification cycles at 60°C for 20 s, and at 72°C for 45 s using a LightCycler 480 system (Roche, Basel, Switzerland). The rt-PCR fluorescence signal for each gene was evaluated with reference to a threshold curve. The results were then normalized against the expression of  $\beta$ -actin, as housekeeping gene. The relative mRNA expression of the tested gene relative to  $\beta$ -actin expression was calculated using the  $2^{-\Delta\text{Cp}}$  method (Livak and Schmittge, 2001).

**Table 1.** Specific forward and reverse primers of NPC1L1, ABCG5, ABCG8, HMGCoA, ACAT and  $\beta$ -actin.

	Forward primer	Reverse primer
<b>NPC1L1</b>	TCCGTGGAGTTCGTGTCCCACATTA	TGGCACCAGCACCTTTGATAGAACC
<b>ABCG5</b>	CCCAAGGGACTCCGGGGTCA	GACCCATGGACCCTCCGGGG
<b>ABCG8</b>	CTTCTACCTCGCCGGGGGCT	CCGCGATGGTGAGGTTCCCG
<b>HMG-CoA</b>	TGGCAGGACCCCTTTGCTTAGATGA	GACGCACAACCTGGGCCACGAG
<b>ACAT</b>	AGCCTTTCCTTGCTGCCAGCC	TGCTCTCCATCCCACCTGCCA
<b><math>\beta</math>-actin</b>	GCCATTTTGGAGAAAGGACA	CTCACATGGCACAAAACACC

NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1, ABCG5/8: ATP binding cassette transporters, HMGCoA: hydroxyl-methylglutaril coenzyme A, ACAT: acyl coenzyme A cholesterol acyl transferase.

**2.6 Measurement of cytokines in supernatants.**  $\text{TNF}\alpha$  (Immunotools, Friesoythe, Germany),  $\text{IL-1}\beta$  (Bionova, Madrid, Spain),  $\text{IL-8}$  (Immunotools, Friesoythe, Germany), and  $\text{IL-10}$  (Immunotools,

Friesoythe, Germany) were determined in cell culture supernatants exposed to 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol by high sensitivity human ELISA procedures according to the instructions of the manufacturer.

**2.7 Statistical analysis.** Differences in cytotoxic potential, proinflammatory effects and changes in expression levels (transporters and enzymes) between treated and control cultures were evaluated by one-way ANOVA and the LSD test, with a significance level of  $p < 0.05$ . Statgraphics Plus version 5.0 (Rockville, Maryland, USA) was used for the statistical analysis.

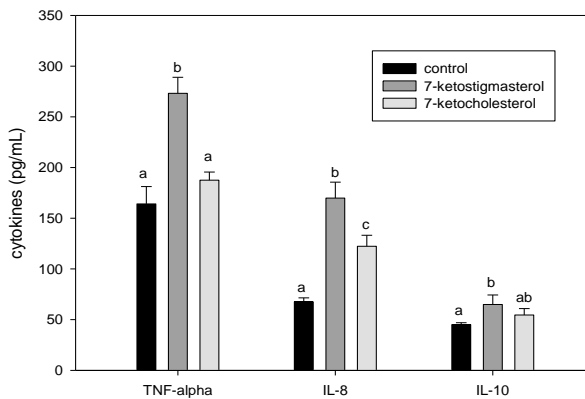
### **3. Results and discussion**

**3.1 Inflammatory potential of 7-ketosterols.** The results of the effects of 7-keto derivatives of stigmasterol and cholesterol upon the production of different proinflammatory ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  and  $\text{IL-8}$ ) and antiinflammatory ( $\text{IL-10}$ ) cytokines by Caco-2 cells are shown in **Figure 1**.

The exposure of Caco-2 cultures to 7-ketostigmasterol increased the production of proinflammatory cytokines such as  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-8}$ , and of antiinflammatory cytokines such as  $\text{IL-10}$ , versus control cells. However, 7-ketocholesterol only induced significantly higher concentrations of  $\text{IL-8}$ . In all cases,  $\text{IL-1}\beta$  concentrations were below the detection limits (6.5 pg/mL). On the other hand, the results obtained demonstrate a greater proinflammatory effect of 7-ketostigmasterol in intestinal Caco-2 cells, compared with 7-ketocholesterol. These effects contrast with the

reportedly higher cytotoxic effects produced by 7-ketocholesterol versus 7-ketostigmasterol in intestinal Caco-2 cells (Alemany et al., 2012).

**Figure 1.** Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL-8 and IL-10) production by Caco-2 cells incubated (3 h) with 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol (60  $\mu$ M). Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=5).



Different letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the different treatments (7-ketostigmasterol and 7-ketocholesterol) in comparison to control values for each measured cytokine (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10).

*In vitro* inflammatory effects produced by POPs (50  $\mu$ M, 24 h) have been little studied, and only referred to the response of U937 monocytic cells (Vejud et al., 2012). These authors reported that neither 7 $\beta$ -hydroxysitosterol nor 7-ketositosterol exerted significant effects upon the production of cytokine MCP-1, while only 7-ketositosterol decreased IL-8 levels. This latter effect is not consistent with that observed in our study

for 7-ketostigmasterol, probably due to the differences in cell line, the type of POPs, and the incubation times used.

Significant differences have been demonstrated in the inflammatory potential of 7-ketocholesterol (12.9  $\mu\text{M}$ ), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholesterol (9.7  $\mu\text{M}$ ), 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholesterol (1.7  $\mu\text{M}$ ), 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (1.3  $\mu\text{M}$ ) and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (4.4  $\mu\text{M}$ ) in Caco-2 cells (2 and 24 h of exposure). These compounds exerted their action through up-regulation of the expression (mRNA) and synthesis of IL-8, 7-ketocholesterol being the compound with the lowest effect at both evaluated timepoints (Mascia et al., 2010) – though this observation would be consistent with the up-regulation observed in this study. In monocytic cell lines (U937 and/or THP-1), several studies have evaluated the relative expression and cytokine production produced by COPs, showing 7-ketocholesterol (50  $\mu\text{M}$ , 24 h) to produce slight (Lemaire-Ewing et al., 2005) and large increments (Prunet et al., 2006) in IL-8 production as quantified by ELISA. However, this increment was found to be greater when evaluated using rt-PCR (Lemaire-Ewing et al., 2005).

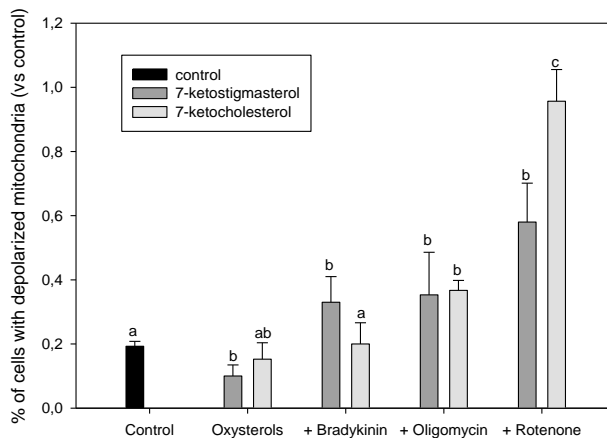
In U937 cells exposed to 7-ketocholesterol, IL-1 $\beta$  has not been detected under the conditions employed (50  $\mu\text{M}$ , 24 h) (Lemaire-Ewing, 2005) studio, in coincidence with our own observations. However, in HUVEC cells, this effect seemed to be directly related to different oxidation in position C7, showing that 7 $\beta$ -hydroxy- and 7-ketocholesterol within the range 25-100  $\mu\text{M}$  (for 24 h), but not 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, positively induce IL-1 $\beta$  cytokine production (Lemaire et al., 1998).

7-ketocholesterol does not modify TNF $\alpha$  production in Caco-2 cells (**Figure 1**), according to the results obtained in HUVEC cells (Lemaire et

al., 1998) and in U937 cells (Lemaire-Ewing et al., 2005, Prunet et al., 2006). To the best of our knowledge, no studies have reported the observed effects of 7-ketostigmasterol upon the production of TNF $\alpha$  (**Figure 1**), which can have important consequences for intestinal epithelium integrity (tight junctions), since the latter is regulated by TNF $\alpha$  concentration in the extracellular media (Song et al., 2004).

**3.2 Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) alteration.** The changes recorded in this study in  $\Delta\Psi_m$  in intestinal (Caco-2) cell cultures exposed to 7-ketosterols are shown in **Figure 2**.

**Figure 2.** Mitochondrial membrane potential in Caco-2 cells not pre-treated or pre-treated (15 min) with bradykinin (5  $\mu$ M), oligomycin (1  $\mu$ M) or rotenone (5  $\mu$ M) and incubated (3 h) with 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol (60  $\mu$ M). Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=5).



Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between each treatment (7-ketostigmasterol and 7-ketocholesterol) in each group (oxysterols, bradykinin, oligomycin, rotenone) in comparison to control values.



At the concentration used (60  $\mu\text{M}$ ), only 7-ketostigmasterol caused a significant decrease in  $\Delta\Psi\text{m}$  compared to the values estimated in control cultures, however, this effect cannot be interpreted as a deleterious effect according to previous results obtained by our group (Alemany et al., 2012). Previous studies have reported that oxidation products such as 7 $\beta$ -hydroxy derivatives (60  $\mu\text{M}$ ) of both  $\beta$ -sitosterol and cholesterol cause mitochondrial depolarization (Roussi et al., 2007), though they trigger different apoptotic, mitochondrial or nuclear pathways (Roussi et al., 2005). These authors evidenced more marked cytotoxic effects for 7 $\beta$ -hydroxycholesterol than for 7 $\beta$ -hydroxysitosterol. Similarly, recent studies have shown that 7-ketocholesterol also causes greater alterations in  $\Delta\Psi\text{m}$  than 7-ketostigmasterol (Alemany et al., 2012). However, these effects were less marked than those reported for the respective 7 $\beta$ -hydroxy derivatives (Roussi et al., 2005, 2007). All these studies evidence that structural differences, and thus differences in lipophilic properties, condition the cytotoxic effects of POPs.

In cell cultures pre-treated with the different compounds, the greatest mitochondrial depolarization was observed after incubation with rotenone, showing increased mitochondrial membrane permeabilization in 7-ketocholesterol-exposed cells, which could be caused by the inhibited production of reducing equivalents in these cultures - thereby indicating the need of those to counteract cytotoxic effects. This effect is in good agreement with the ability of COPs to induce oxidative stress contributing to atherogenesis and other degenerative diseases (Lordan et al., 2009, Otaegui-Arrazola et al., 2010). In contrast, oxidative stress induced by

POPs has been scantily described in Caco-2 cells (Roussi et al., 2007), showing  $7\beta$ -hydroxysterol to decrease reactive oxygen species accumulation versus control cells. Oligomycin-treated cells showed greater mitochondrial depolarization when incubated with both 7-ketosterols than control cells (**Figure 2**). However, in bradykinin-exposed cells, only 7-ketostigmasterol was able to induce alterations in  $\Delta\Psi_m$ . These results indicate that both compounds interact with the mitochondria prior to the appearance of cytotoxic effects, and the more marked effects upon  $\Delta\Psi_m$  of cell cultures incubated with rotenone link these effects to the impairment of intracellular redox status and lesser production of reducing equivalents in these cultures. In addition, cytotoxic effects associated to 7-ketostigmasterol could also be mediated by alterations in intracellular calcium ( $[Ca]_i$ ). Interestingly, HMG-CoA, which constitutes a key enzyme in cholesterol metabolism, is strictly regulated by  $[Ca]_i$  - suggesting that both 7-ketoderivatives can exert different modulating effects upon this metabolic pathway.

**3.3 Changes in sterol transport proteins.** The Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) membrane transporter has been implicated in the intestinal absorption of highly lipophilic compounds, including cholesterol (Sato et al., 2012). However, the intracellular balance also depends on the equilibrium with other proteins such as ATP-binding cassette G5 and 8, facilitating the efflux of sterols from cells (Ryan et al., 2009). **Figure 3** shows changes in expression (mRNA) levels of NPC1L1, ABCG5 and ABCG8 in Caco-2 cell cultures, pre-treated or not with the

aforementioned compounds and exposed to 7-ketostigmasterol and 7-ketocholesterol (60  $\mu$ M) for 3 hours.

In control cultures incubated with either 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol (**Figure 3A**), the results revealed no alterations in the NPC1L1 internalization system. In contrast to control cells, Caco-2 cells pre-treated with bradykinin (**Figure 3B**) or rotenone (**Figure 3C**) displayed an up-regulated expression of NPC1L1 when incubated with 7-ketostigmasterol - likely suggesting an increased intracellular concentration of this compound, in contrast to the absence of significant changes in cell cultures pre-treated with oligomycin (**Figure 3D**). In the case of cell treatment with this latter inhibitor in the presence of 7-ketocholesterol, NPC1L1 was not detectable, thus indicating down-regulation of the expression levels of this transporter.

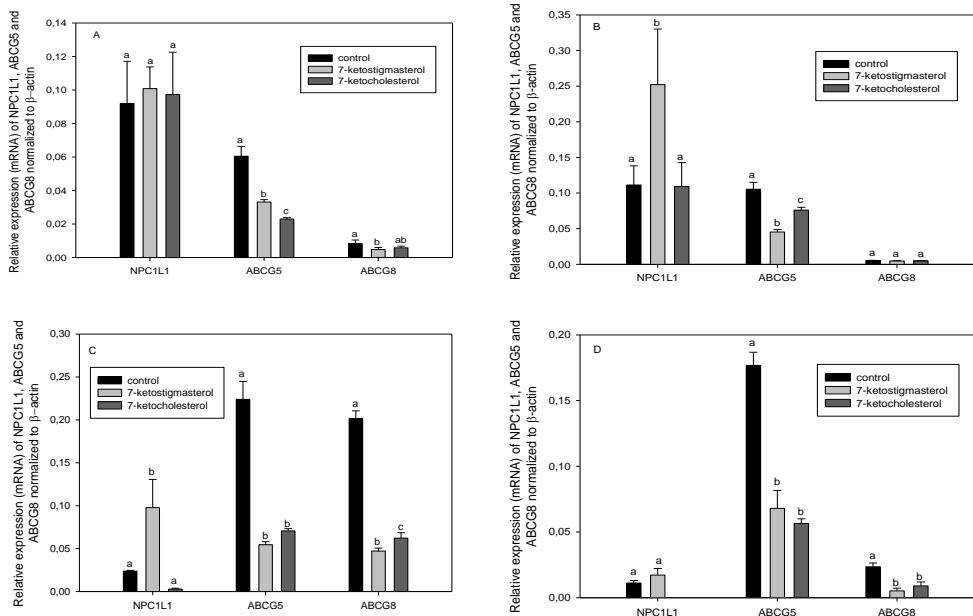
Several studies have described the crucial role of NPC1L1 in the intestinal uptake and absorption of plant sterols/stanols (Davis et al., 2004, De Smet et al., 2012), as an additional mechanism to passive diffusion. The expression levels of NPC1L1 have been directly associated to higher protein concentration (Chen et al., 2011), and consequently increased cholesterol absorption rates can be expected from the data presented in this study. It has been shown that both 7-keto derivatives had no effect upon the expression levels of NPC1L1, likely suggesting that both 7-ketocholesterol and 7-ketostigmasterol do not interfere with cholesterol absorption, as described for some other oxysterols (Brown and Jessup, 2009). The results presented are in accordance with the non-altered expression levels of NPC1L1 in intestinal tissue samples from hamsters fed with oxidized derivatives of  $\beta$ -sitosterol or stigmasterol (Liang et al.,

2011). Moreover, recent *in vivo* and *in vitro* studies have appeared, showing that phytosterols cannot bind to the luminal *N*-terminal domain of the NPC1L1 protein (Zhang et al., 2011). These data have contributed to suggest that NPC1L1 is not involved in decreased cholesterol absorption after plant sterol or stanol intake (De Smet et al., 2012). This is in good accordance with the results obtained, indicating that the studied oxysterols exhibit similar behavior.

There are no other studies involving expression changes of transporters related to cholesterol metabolism after exposure to the compounds used in the present study. However, down-regulated NPC1L1 expression has been associated to endoplasmic reticulum (ER) stress and activation of the unfolded protein response pathway (Chen et al., 2011). Accordingly, up-regulation of NPC1L1 expression levels observed in cell cultures pre-treated with bradykinin after exposure to 7-ketostigmasterol suggests its interaction with ER signaling that is not affected by 7-ketocholesterol.

In general, in all cases the ABCG5 efflux system was down-regulated in the presence of either 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol, with or without inhibitor pre-treatment. Of note was an increased down-regulation in 7-ketostigmasterol-incubated cells pre-treated with bradykinin, which would support the influence of calcium in the regulatory mechanism of 7-ketostigmasterol. It should be noted that the expression levels of ABCG8 were down-regulated in the cell cultures incubated with the inhibitors that alter energetic metabolism (rotenone, oligomycin) (**Figure 3C, 3D**).

**Figure 3.** Expression (mRNA) levels of proteins to sterol influx (NPC1L1) and efflux (ABCG5 and -8) in Caco-2 cell cultures not pre-treated (A) or pre-treated (15 min) with bradykinin (5  $\mu$ M) (B), rotenone (5  $\mu$ M) (C) or oligomycin (1  $\mu$ M) (D) and incubated (3 h) with 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol (60  $\mu$ M). Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=5).



Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the relative expression of cells exposed to the different treatments (7-ketostigmasterol and 7-ketocholesterol) in comparison to control cells for each transporter (NPC1L1, ABCG5, ABCG8) monitored.

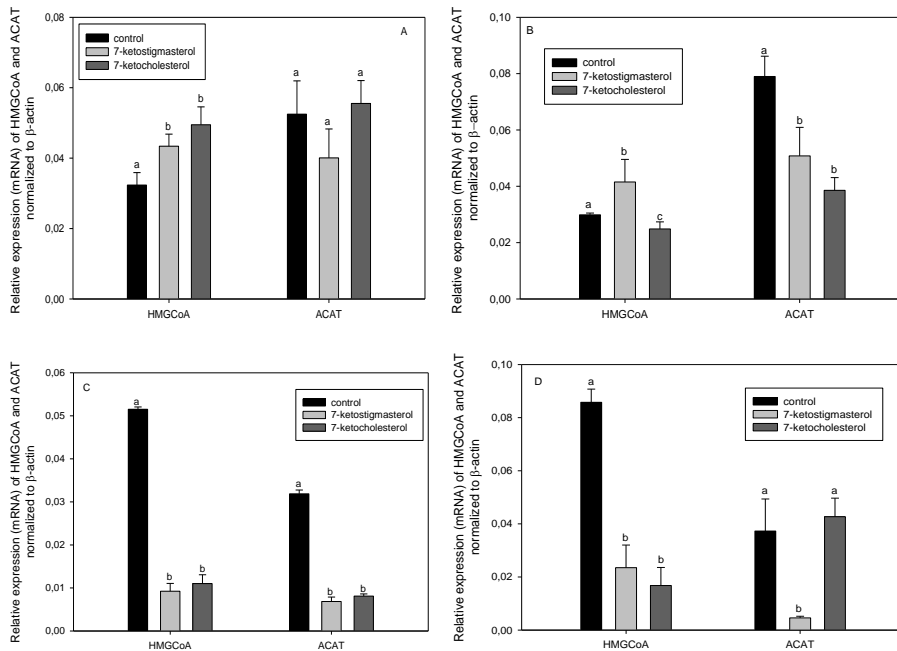
Previous studies showed that a mixture containing  $7\alpha/\beta$ -hydroxy,  $\alpha/\beta$ -epoxy and 7-ketoderivatives of  $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol did not interact with LXR (ABC transporter regulator) (Sudhop et al.,

2005), and consequently had no effects upon ABCG5/G8 expression levels in Caco-2 cells (Plat and Mensink, 2005). In good agreement with this study, *in vivo* animal (hamster) data support the down-regulated expression of ABCG5 transporter, without altering ABCG8 expression levels, when administered with a mixture of oxidized derivatives of  $\beta$ -sitosterol or stigmasterol (Liang et al., 2011). Besides NPC1L1, the expression levels of ABCG5/8 transporters seemed not to be altered by either DTT-induced ER stress or activation of the unfolded protein pathway in Caco-2 cells (Chen et al., 2011). In the case of energetic metabolism and reducing equivalents, the results suggest different influences in the cellular internalization of 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol.

**3.4 Changes in cholesterol metabolism proteins.** The expression levels of key enzymes such as HMG-CoA and ACAT in Caco-2 cells cultures, pre-treated or not pre-treated with the different compounds and exposed to 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol, are shown in **Figure 4**.

After exposure to both 7-keto derivatives, Caco-2 cell cultures exhibited significant ( $p<0.05$ ) up-regulation in HMG-CoA expression levels (**Figure 4A**). However, cell cultures pre-treated with all compounds tested (**Figure 4B, 4C, 4D**) showed significant ( $p<0.05$ ) down-regulation in the expression levels of this enzyme, except in bradykinin pre-treated cells incubated with 7-ketostigmasterol (**Figure 4B**).

**Figure 4.** Expression (mRNA) levels of proteins to cholesterol metabolism (ACAT and HMG-CoA) in Caco-2 cell cultures not pre-treated (A) or pre-treated (15 min) with bradykinin (5  $\mu$ M) (B), rotenone (5  $\mu$ M) (C) or oligomycin (1  $\mu$ M) (D) and incubated (3 h) with 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol (60  $\mu$ M). Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=5).



Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the relative expression of cells exposed to the different treatments (7-ketostigmasterol and 7-ketocholesterol) in comparison to control cells for each enzyme (HMGCoA, ACAT) monitored.

To the best of our knowledge, no studies have evaluated the effect of these inhibitors upon the relative expression of the enzymes involved in cholesterol metabolism. The up-regulated HMG-CoA expression levels

can reflect increased protein synthesis, in good concordance with the increased degradation of HMG-CoA reductase caused by cholesterol oxides (Brown and Jessup, 2009). HMG-CoA phosphorylation processes promote the inactive state of the enzyme through the coordinated action of cAMP- (AMPK) and calmodulin-dependent (CaMKK) protein-kinase activated by increases in  $[Ca]_i$  (Stryer, 2007). This regulation of HMG-CoA activity was only reflected in cell cultures pre-treated with bradykinin and exposed to 7-ketostigmasterol (**Figure 4B**), suggesting the greater inhibitory effect of 7-ketostigmasterol upon HMG-CoA reductase activity. In these cultures, cholesterol availability could be limited for cell growth, leading cells to apoptosis (Roussi et al., 2005), and the increased expression levels detected could be a reflection of the cell adaptation response. This hypothesis concerning the effect caused by 7-ketostigmasterol is supported by the increased NPC1L1 expression levels found in cell cultures pre-treated with bradykinin and exposed to this 7-keto derivative (**Figure 3B**).

In control cells, no changes in ACAT mRNA expression levels were observed (**Figure 4A**). In accordance with the results obtained, only one study in hamsters reported that ACAT2 expression values were not altered when the animals were fed a mixture of stigmasterol or  $\beta$ -sitosterol oxides (0.1% w/w, for 6 weeks) (Liang et al., 2011). Cell cultures pre-treated with inhibitors (**Figure 4B, 4C, 4D**) showed significant ( $p < 0.05$ ) down-regulation of the expression levels of ACAT after exposure to both 7-ketoderivatives, except in oligomycin pre-treated cells incubated with 7-ketocholesterol (**Figure 4D**) - thus suggesting the importance of reducing equivalents in this COP esterification. The different effects evidence high



specificity of this enzyme for cholesterol metabolism. It has been reported that PS esterification rates are lower than cholesterol esterification rates (Temel et al., 2003, Lin et al., 2010), which could explain the lesser regulation of ACAT of 7-ketocholesterol versus 7-ketostigmasterol.

#### **4. Conclusions**

In this study, a greater inflammatory potential has been observed for 7-ketostigmasterol versus 7-ketocholesterol in intestinal epithelial (Caco-2) cells. However, it has to be kept on mind that concentration of stigmasterol oxides is going to be always much lower than that of cholesterol oxides. The mechanism by which 7-ketostigmasterol interacts with cholesterol metabolism seems to be influenced by  $[Ca]_i$ , with regulation by the endoplasmic reticulum – thus pointing to 7-ketostigmasterol-mediated regulation interacting with the oxysterol binding protein located in the endoplasmic reticulum. On the other hand, energy production seems to modulate the influence of 7-ketosterols in cholesterol metabolism, thereby showing the energetic requirements in sterol homeostasis.

#### **Acknowledgements**

This study was financially supported by project AGL2008-02591-C02-01 (CICYT-FEDER), and partially funded by Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063. Thanks are due to the SCSIE from the University of Valencia for its support. Laia Alemany-Costa holds a grant from the Generalitat Valenciana (Spain).

## **References**

Alemany, L., Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría, A., 2012. Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. *Food Chem Toxicol*, 50, 3106-3113.

Brown, A.J., Jessup, W., 2009. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med*, 30, 111-122.

Chen, J., Li Q., Zhang Y., Yang P., Zong Y., Qu S., Liu Z., 2011. Oleic acid decreases the expression of a cholesterol transport-related protein (NPC1L1) by the induction of endoplasmic reticulum stress in Caco-2 cells. *J Physiol Biochem*, 67, 153-63.

Cilla, A., Laparra, J.M., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., 2008. Antioxidant effect derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chem*, 106, 1180–1187.

Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S.P.N., Lam, M-H., Lund, E.G., Detmers, P.A., Graziano, M.P., Altmann, S.W., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279, 33586–33592.

De Smet, E., Mensink, R.P., Plat, J., 2012. Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: Suggested mechanisms from past to present. *Mol Nutr Food Res*, 56, 1058-1072.

García-Llatas, G., Rodríguez-Estrada, M.T., 2011. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem Phys Lipids*, 164, 607-624.

Hui, D.Y., Howles, P.N., 2005. Molecular mechanism of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Cell Develop Biol*, 16, 183-192.

Koschutnig, K., Heikkinen, S., Kemmo, S., Lampi, A.M., Piironen, V., Wagner, K.H., 2009. Cytotoxic and apoptotic effects of single and mixed oxides of  $\beta$ -sitosterol on HepG2-cells. *Toxicol in Vitro*, 23, 755-762.

Laparra Llopis, J.M., Sanz Herranz, Y., 2010. Gliadins induce TNF $\alpha$  production through cAMP-dependent protein kinase A activation in intestinal cells (Caco-2). *J Physiol Biochem*, 66, 153-159.

Lemaire, S., Lizard, G., Monier, S., Miguet, C., Gueldry, S., Volot, F., Gambert, P., Néel, D., 1998. Different patterns of IL-1 $\beta$  secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett*, 440, 434-439.

Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montagne, T., Vejux, A., Berthier, A., Bessède, L., Corcos, L., Gambert, P., Néel, D., Lizard, G., 2005. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol*, 21, 97-114.

Leonarduzzi, G., Sevanian, A., Sottero, B., Arkan, M.C., Biasi, F., Chiarpotto, E., Basaga, H., Poli, G., 2001. Up-regulation of the fibrogenic cytokine TGF-beta1 by oxysterols: a mechanistic link between cholesterol and atherosclerosis. *Faseb J*, 15, 1619-1621.

Liang, Y.T., Wong, W.T., Guan, L., Tian, X.Y., Ma, K.Y., Huang, Y., Chen, Z., 2011. Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219, 124-133.

Lin, D.S., Steiner, R.D., Merkens, L.S., Pappu, A.S., Connor, W.E., 2010. The effects of sterol structure upon sterol esterification. *Atherosclerosis*, 208, 155-160.

Livak, K.J., Schmittge, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25, 402-408.

Lizard, G., Lemaire, S., Monier, S., Gueldry, S., Néel, D., Gambert, P., 1997. Induction of apoptosis and of interleukin-1 $\beta$  secretion by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett*, 419, 276-280.

Lordan, S., Mackrill, J.J., O'Brien, N.M., 2009. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J Nutr Biochem*, 20, 321-336.

Mascia, C., Maina, M., Chiarpotto, E., Leonarduzzi, G., Poli, G., Biasi, F., 2010. Proinflammatory effect of cholesterol and its oxidation products on Caco-2 human enterocyte-like cells: effective protection by epigallocatechin-3-gallate. *Free Radical Bio Med*, 49, 2049-2057.

Otaegui-Arazola, A., Menendez-Carreño, M., Ansorena, D., 2010. Oxysterols: A world to explore. *Food Chem Toxicol*, 48, 3289-3303.

Othman, R.A., Moghadasian, M.H., 2011. Beyond cholesterol-lowering effects of plant sterols: clinical and experimental evidence of anti-inflammatory properties. *Nutr Rev*, 69, 371-382.

Plat, J., Mensink, R.P., 2005. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol*, 96, 15D-22D.

Prunet, C., Montagne, T., Véjux, A., Laubriet, A., Rohmer, J-F., Riedinger, J-M., Athias, A., Lemaire-Ewing, S., Néel, D., Petit, J-M., Steinmetz, E., Brenot, R., Gambert, P., Lizard, G., 2006. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *ISAC*, 69A, 359-373.

Roussi, S., Winter, A., Gosse, F., Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F., 2005. Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of  $7\beta$ -hydroxysterol and  $7\beta$ -hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ*, 12, 128-135.

Roussi, S., Gossé, F., Aoudé-Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F., 2007. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in  $7\beta$ -hydroxysterol and  $7\beta$ -hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, 12, 87- 96.

Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2005. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxicity and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Brit J Nutr*, 94, 443-451.

Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2005. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxicity and

apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Brit J Nutr*, 94, 443-451.

Ryan, E., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M., 2009. Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev Int*, 25, 157-174.

Sato, Y., Suzuki, R., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Noda, T., Mizuno, S., Sugawara, M., Iseki, K., 2012. Involvement of cholesterol membrane transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in the intestinal absorption of lutein. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 15, 256-264.

Song, H.-L., Lu, S., Ma, L., Li, Y., Liu, P., 2004. Effect of TNF- $\alpha$  on tight junctions between the epithelial cells of intestinal mucosal barrier. *World Chinese Journal of Digestology*, 12, 1303-1306.

Stryer, L., 1988. *Bioquímica*, third ed. Barcelona, Spain.

Sudhop, T., Lütjohann, D., von Bergmann, K., 2005. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol Therapeut*, 105, 333-341.

Temel, R.E., Gebre, A.K., Parks, J.S., Rudel., L.L., 2003. Compared with Acyl-CoA: Cholesterol *O*-Acyltransferase (ACAT) and Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem*, 278, 47594-47601.

Vejux, A., Montagne, T., Martine, L., Zarrouk, A., Riedinger, J-M., Lizard, G., 2012. Absence of oxysterol-like side effects in human monocytic cells treated with phytosterol and oxyphytosterols. *J Agr Food Chem*, 60, 4060-4066.

Zhang, J. H., Ge, L., Qi, W., Zhang, L., Miao, H.-H., Li, B.-L., Yang, M., Song, B.-L., 2011. The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake. *J Biol Chem.* 286, 25088–25097.





*7. Efectos citotóxicos de 7-cetoesteroles en células del  
hepatoma humano (HepG2)*

Dado que en los estudios realizados previamente en células Caco-2 (ver apartado 5) se demuestra que la diana de citotoxicidad de los óxidos de esteroides estudiados es la mitocondria, los ensayos preliminares realizados sobre las células hepáticas (HepG2) se han centrado en este compartimento subcelular.

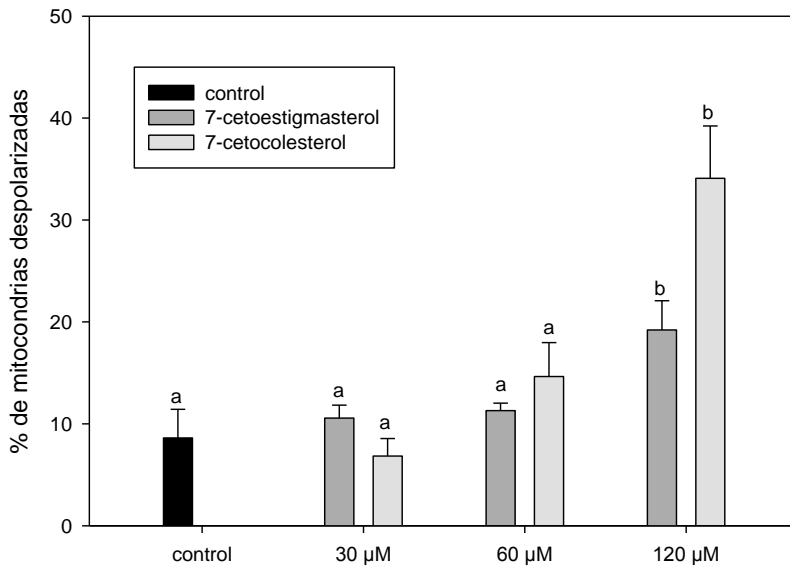
Con el objeto de evaluar la influencia de la concentración de los 7-cetoesteroides (7-cetoestigmasterol y 7-cetocolesterol) en células HepG2, se exponen dichas células a distintas concentraciones (30, 60, 120  $\mu\text{M}$ ) durante 24h.

Paralelamente, y para estudiar la posible interacción entre dos mismas estructuras oxidadas procedentes de diferentes esteroides, utilizando el estigmasterol como referencia, las células hepáticas se incuban con 7-cetoestigmasterol, 7-cetocolesterol o estigmasterol individualmente o con las siguientes asociaciones: 7-cetoestigmasterol + 7-cetocolesterol, estigmasterol + 7-cetoestigmasterol o estigmasterol + 7-cetocolesterol a concentraciones de 120  $\mu\text{M}$  de cada compuesto durante 24h.

En ambos ensayos, se evalúa el potencial citotóxico de los compuestos objeto de estudio mediante la determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) (ver anexo II, apartado C.1.1.3).

En la **figura nº 13** se muestran los porcentajes de mitocondrias despolarizadas en los cultivos celulares tratados con diferentes concentraciones de los 7-cetoesteroides individuales.

Figura n° 13. Potencial de membrana mitocondrial en células hepáticas (HepG2) tratadas con distintas concentraciones de 7-cetoesteroles.

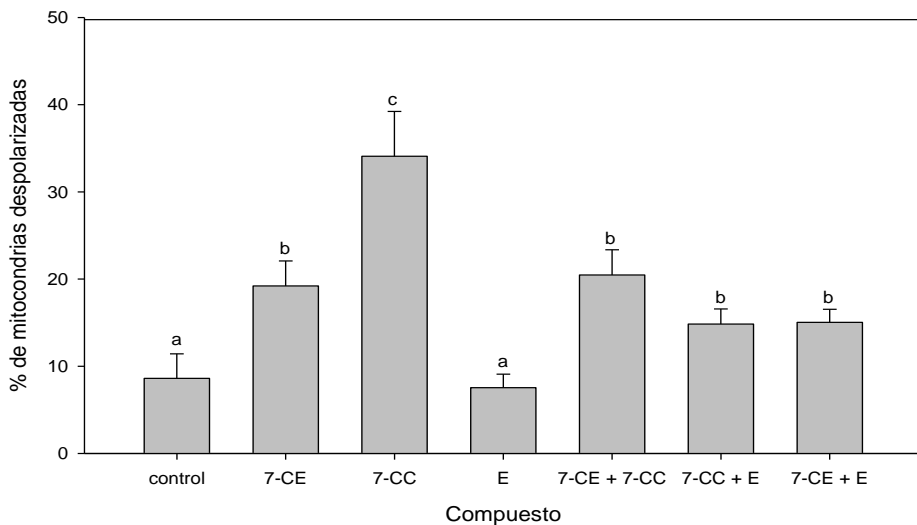


Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los cultivos tratados con 7-cetostigmasterol o 7-cetocolesterol ( $n=5$ ).

Los cultivos celulares expuestos a ambos oxisteroles muestran comportamientos similares. A las concentraciones más bajas (30-60 $\mu$ M) no se observa efecto citotóxico, mientras que a concentración de 120  $\mu$ M existe un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del porcentaje de mitocondrias despolarizadas tras la exposición a ambos óxidos, si bien, dicho incremento es más acusado con el 7-cetocolesterol, lo que sugiere el mayor potencial citotóxico del derivado del colesterol. Este hecho es similar al observado en las células Caco-2 (ver apartado 5).

En la **figura n° 14** se muestra el porcentaje de mitocondrias despolarizadas tras el tratamiento de los cultivos celulares con los 7-cetoesteroles individuales y mezclas.

Figura n° 14. Potencial de membrana mitocondrial en células hepáticas (HepG2) tratadas con los óxidos individuales o mezclas.



7-CE: 7-cetoestigmasterol, 7-CC: 7-cetocolesterol, E: estigmasterol. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) ( $n=5$ ).

Se observa que el 7-cetoestigmasterol, a la concentración de  $120 \mu\text{M}$  y 24h de incubación presenta un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) del porcentaje de mitocondrias despolarizadas frente a los cultivos control, sin embargo, es capaz de reducir estadísticamente ( $p < 0,05$ ) el daño celular causado por el 7-cetocolesterol sobre las HepG2. El estigmasterol no presenta efecto citotóxico en las HepG2 pero, a

diferencia de lo observado en células Caco-2 (ver apartado 5), no disminuye estadísticamente ( $p > 0,05$ ) el efecto citotóxico de los 7-cetoesteroles.

Los resultados obtenidos en células HepG2 y Caco-2 ponen de manifiesto una mayor susceptibilidad de los cultivos hepáticos sobre la citotoxicidad de los compuestos ensayados.



## *8. Obtención de óxidos de esteroides*

Dado que solo existe un óxido de EV comercializado, el 7-cetoestigmasterol, se plantea la obtención de óxidos de esteroides por termooxidación y separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el fin de poder evaluar sus efectos biológicos.

### **8.1 Selección de un método de termooxidación**

Se realiza un ensayo preliminar con el fin de seleccionar un método de termooxidación con el que se formen mayor cantidad de POPs.

Se ensayan dos métodos: Conchillo et al. (2005) (150°C, 2h) y Koschutnig et al. (2010) (130°C, 24h) (ver anexo II, apartado A.2 y D.1, respectivamente). El primero de ellos se ha utilizado para la identificación de POPs por nuestro grupo de investigación y el segundo aplica condiciones de temperatura y tiempos de termooxidación que se sitúan en los valores más altos utilizados en la bibliografía. En este sentido Rudzinska et al. (2009), indican que el mayor rendimiento en la obtención de POPs se obtiene tras una termooxidación a 120°C durante 24h, condiciones similares a las utilizadas en este segundo método.

Paralelamente se determina el contenido de EV en la mezcla de patrón sin termooxidar y en las mezclas termooxidadas por ambos métodos ensayados (ver anexo II, apartado A.2 *identificación y cuantificación*). Los resultados se recogen en el **cuadro nº 14**.



Cuadro n° 14. Contenidos de esteroides vegetales en las mezclas patrón ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de estándar).

	<b>Sin termooxidar</b>	<b>Método A</b>	<b>Método B</b>
Campesterol	50,75 $\pm$ 1,41	1,07 $\pm$ 0,23	4,10 $\pm$ 0,01
Campestanol	10,11 $\pm$ 1,40	2,65 $\pm$ 0,29	3,53 $\pm$ 0,06
Estigmasterol	4,74 $\pm$ 0,40	0,73 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,16
$\beta$ -Sitosterol	526,76 $\pm$ 4,36	68,59 $\pm$ 0,64	41,82 $\pm$ 1,10
Sitostanol	103,62 $\pm$ 7,23	25,12 $\pm$ 1,27	34,27 $\pm$ 0,40
<b>Total EV</b>	<b>695,98 <math>\pm</math> 4,11</b>	<b>98,16 <math>\pm</math> 4,11</b>	<b>84,40 <math>\pm</math> 1,26</b>

Método A: 150°C, 2h (Conchillo et al., 2005), método B: 130°C, 24h (Koschutnig et al., 2010) EV: esteroides vegetales. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 2).

Con el método B se obtiene un contenido total de EV sin oxidar menor que con el método A. Además, el menor contenido en  $\beta$ -sitosterol, presupone una mayor formación de los óxidos derivados de este EV, cuya presencia es mayoritaria en los alimentos y, por ello, se selecciona el método B.

Señalar que en los métodos de termooxidación utilizados (Conchillo et al., 2005, Koschutnig et al., 2010) no se indica el contenido en EV tras la termooxidación. Sin embargo, en un trabajo previo (Rudzinska et al., 2009), se han determinado los contenidos de EV tras la termooxidación como indicador indirecto de la misma. Para ello, tras someter una mezcla de  $\beta$ -sitosterol (71%), sitostanol (19%), campesterol (8%) y campestanol (2%) a termooxidación (120°C, 24h), obtienen 358  $\mu\text{g}$  de EV/mg estándar. Este contenido es 4 veces superior al obtenido en el presente trabajo (ver

cuadro n° 14), lo que indica una mayor formación de POPs a partir de las condiciones utilizadas (130°C, 24h) en este estudio. Sin embargo, estos mismos autores (Rudzinska et al., 2009), indican que la aplicación de temperaturas por encima de 60°C promueve la formación, a partir de los EV, de compuestos secundarios, como dímeros, trímeros, tetrámeros, compuestos volátiles y moléculas de fragmentación de los EV, además de los POPs.

## **8.2 Obtención y separación de los óxidos de esteroides por cromatografía líquida de alta resolución**

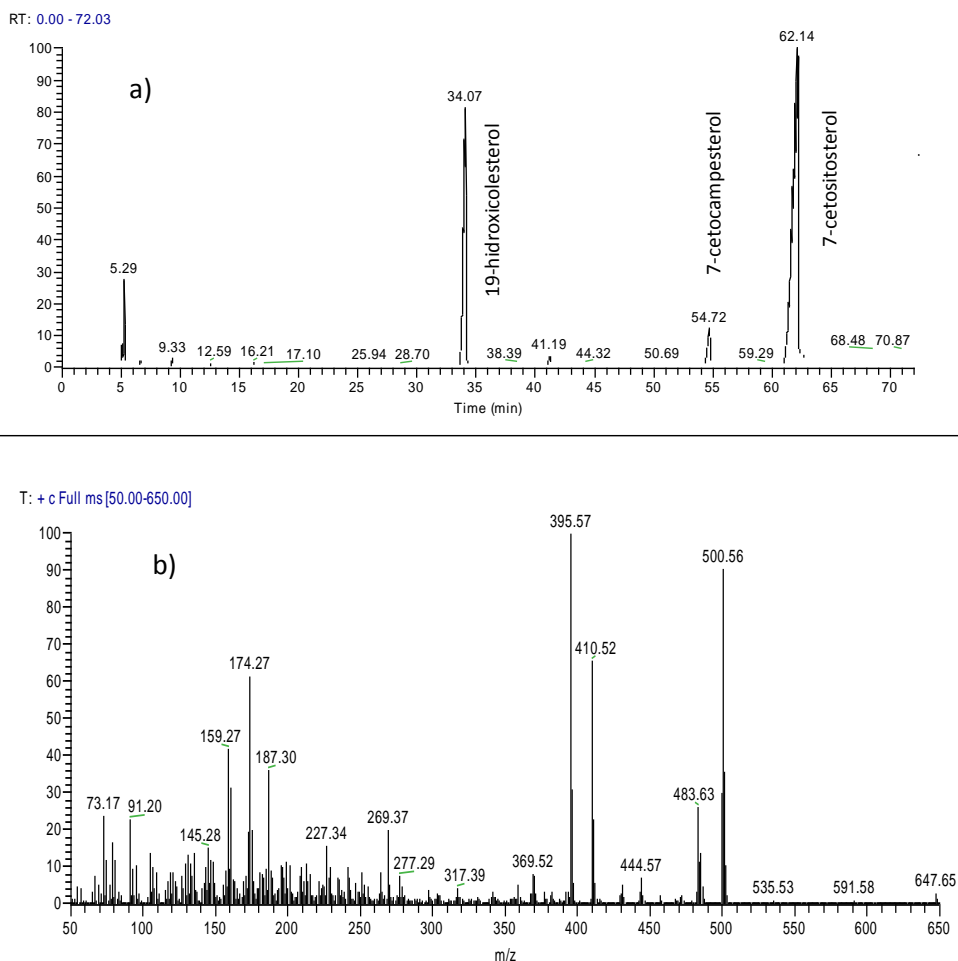
Con el fin de obtener cantidad suficiente de POPs para la realización de ensayos de citotoxicidad, se aplica el método de Koschutnig et al. (2010) (método que proporciona un mayor rendimiento en la formación de POPs) para su obtención a mayor escala. Se termooxidan seis alícuotas de 300 mg del patrón anteriormente descrito, se purifica y se inyecta cada alícuota en HPLC de acuerdo a las condiciones indicadas en el anexo II, apartado D.3.

Se recogen las fracciones correspondientes a los tiempos de retención (tr): 5,8, 7,1, 9,9, 11,9, 13,9 y 14,8 minutos y se analizan por GC-MS. La selección de los tr mencionados se realiza en base a la mayor abundancia de dichos picos cromatográficos y por analogía a los tr de los compuestos determinados en el estudio de Koschutnig et al. (2010).

Los POPS identificados por GC-MS (anexo II, apartado A.2, Método GC-MSB) en las fracciones son: 7-ceto (tr: 9,9 min), triol (tr: 11,9 min), 7 $\beta$ -hidroxi (tr: 13,9 min) y 7 $\alpha$ -hidroxiderivado (tr: 14,8 min). A modo de

ejemplo, en la **figura n° 15** se muestran el cromatograma (a) y el espectro (b) obtenidos tras el análisis del 7-cetoderivado.

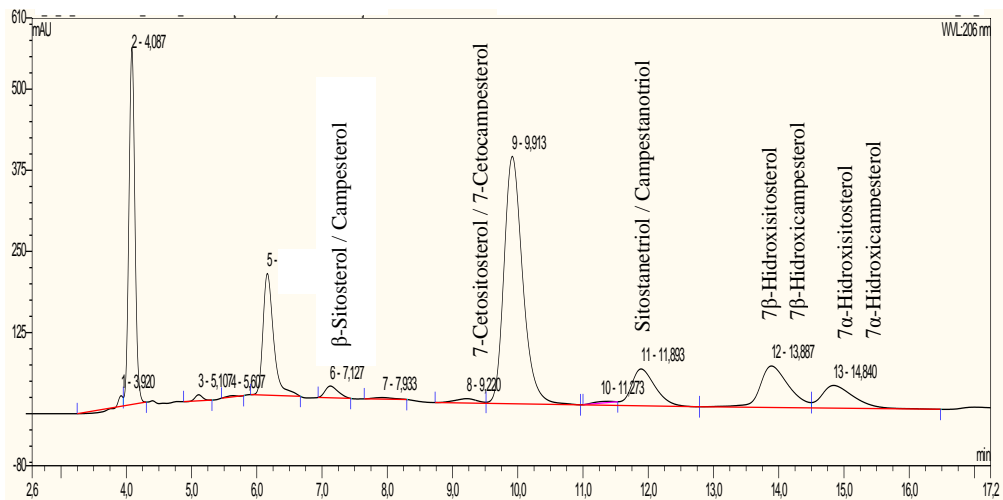
Figura n° 15. Cromatograma (a) y espectro (b) correspondientes al 7-cetoderivado.



En el cromatograma (**figura n° 15a**) se observa el pico a 34,07 min correspondiente al PI (19-hidroxicolesterol), así como el 7-cetocampesterol (tr: 54,71 min) y 7-cetositosterol (tr: 62,14 min). Señalar la mayor abundancia del 7-cetositosterol *versus* el 7-cetocampesterol. En la **figura n° 15b** se observa el espectro correspondiente a la identificación del 7-cetositosterol, con sus iones característicos.

En la **figura n° 16** se muestra el cromatograma de una de las seis alícuotas termooxidadas y separadas por HPLC.

Figura n° 16. Perfil cromatográfico de los óxidos obtenidos por termooxidación y separados por HPLC.



Los POPs identificados en este estudio (7-ceto y 7 $\alpha$ / $\beta$ -hidroxi derivados de campesterol y  $\beta$ -sitosterol) han sido identificados también por Koschutnig et al. (2010). Sin embargo, estos autores no detectan el derivado triol, pero sí identifican una mezcla de isómeros (6 $\beta$ -hidroxi-3-

cetositosterol/6 $\alpha$ -hidroxi-3-cetositosterol) que no se observa en el presente trabajo.

Por otro lado, el perfil de POPs obtenido difiere al indicado por Conchillo et al. (2005), quienes termooxidan (150°C, 2h) un estándar similar al utilizado en este trabajo (75%  $\beta$ -sitosterol, 13% sitostanol, 8% campesterol), identificando 7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi,  $\beta$ -epoxi,  $\alpha$ -epoxi y 7-cetositosterol (Conchillo et al., 2005). En otro estudio más reciente (Rudzinska et al., 2009), tras la termooxidación (120°C, 24h) de un estándar constituido por  $\beta$ -sitosterol (71%), sitostanol (19%), campesterol (8%) y campestanol (2%), se identifican 7 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -hidroxi,  $\beta$ -epoxi,  $\alpha$ -epoxiderivados de  $\beta$ -sitosterol y campesterol y triol, 25-hidroxi y 7-cetoderivado de  $\beta$ -sitosterol. Estos resultados ponen de manifiesto que las condiciones de termooxidación influyen en el perfil de los POPs obtenido.

### **8.3 Evaluación del rendimiento y la pureza de los óxidos de esteroides vegetales obtenidos**

Una vez identificados los POPs, se reúnen las distintas fracciones del mismo compuesto obtenidas a partir de cada una de las seis alícuotas. Se evapora el disolvente, se pesa el residuo (R) y se cuantifican los POPs por GC-FID. En el **cuadro n° 15** se indican los pesos de los residuos y la cuantificación de POPs por GC-FID en cada una de las fracciones separadas por HPLC.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que no todo el residuo obtenido (R) corresponde a POPs. La pureza determinada en el trabajo de Koschutnig et al. (2010), es superior (70-88%). Es importante remarcar que la elución de los POPs en la etapa de purificación se ha realizado a un

flujo aproximado de 4,2 mL/min (por gravedad), lo que podría dar lugar a una elución incompleta de estos compuestos y, por lo tanto menor grado de pureza. En el estudio de Koschutnig et al. (2010), no se indica el flujo de elución para la purificación de la mezcla termooxidada. Por otro lado, la presencia de polímeros en la fracción correspondiente a cada óxido, que no aparecen en el espectro de GC-MS dada su gran masa molecular, podría explicar también los valores de pureza bajos obtenidos.

Cuadro n° 15. Óxidos de esteroides vegetales: Cuantificación y grado de pureza.

Fracción recogida (tr)		Identificación*	R (mg)	Contenido de POPs (mg/residuo) (G)	Pureza	% Relativo
9,9	<b>7-Ceto</b>	7-Cetositosterol	40,20	24,27	<b>66,6</b>	90,7
		7-Cetocampesterol		2,50		9,4
11,9	<b>Triol</b>	Sitostanotriol	7,60	2,24	<b>31,9</b>	92,4
		Campestanotriol		0,18		7,6
13,9	<b>7β-Hidroxi</b>	7β-Hidroxisitosterol	14,50	6,58	<b>49,2</b>	92,2
		7β-Hidroxicampesterol		0,56		7,8
14,8	<b>7α-Hidroxi</b>	7α-Hidroxisitosterol	11,60	4,11	<b>41,1</b>	86,3
		7α-Hidroxicampesterol		0,65		13,7

\*: ver **figura n° 14**, tr: tiempo de retención. R: peso del residuo de cada fracción recogida por HPLC (n = 6 alícuotas). Pureza: G/R\*100, % relativo: POPs individuales/POPs totales en cada fracción\*100.

El óxido mayoritario en el presente trabajo corresponde al 7-cetoderivado, al igual como sucede en el trabajo de Koschutnig et al. (2010) y en el de Conchillo et al. (2005) con condiciones de termooxidación diferentes (150°C, 2h). Sin embargo, al disminuir la temperatura a la que se someten las disoluciones patrón (120°C, 24h), Rudzinska et al. (2009), cuantifican mayores contenidos de 7 $\beta$ - y 7 $\alpha$ -hidroxistosterol que del 7-cetoderivado, lo que podría explicarse, al menos en parte, por la utilización de temperaturas menos agresivas que no conseguirían oxidar el grupo hidroxilo a grupo ceto.

Los contenidos de POPs determinados en el presente trabajo (**cuadro n° 15**), corresponden a los productos de oxidación formados a partir de 1800 mg de estándar inicial. Para conocer el rendimiento de la termooxidación realizada, se ha calculado la producción de POPs (g) en 100 g de estándar de EV (**cuadro n° 16**).

El rendimiento obtenido en este trabajo es ligeramente superior al obtenido por Rudzinska et al. (2009) (6,41%) y similar al método de Koschutning et al. (2010) (10%) utilizado en el presente trabajo.

Dada la baja pureza obtenida analíticamente para los compuestos identificados, se deben optimizar los parámetros de purificación para su obtención a gran escala. Probablemente una elución más ralentizada y controlada (1 mL/min) y una optimización de los disolventes de purificación podría mejorar la pureza de los POPs obtenidos.



Cuadro n° 16. Cantidad de esteroides vegetales y sus óxidos determinados antes y después de la termooxidación (g/100 g de estándar).

<b>Compuestos</b>	<b>Termooxidado</b>	<b>Sin termooxidar</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>β-Sitosterol</b>	4,182	52,676	
7α-hidroxi	0,228		
7β-hidroxi	0,366		
triol	0,124		
7-ceto	1,348		
<b>TOTAL</b>	<b>6,248</b>		<b>11,86</b>
<b>Campesterol</b>	0,410	5,075	
7α-hidroxi	0,036		
7β-hidroxi	0,031		
triol	0,010		
7-ceto	0,139		
<b>TOTAL</b>	<b>0,626</b>		<b>12,33</b>
<b>EV TOTALES</b>	<b>4,592</b>	<b>57,751</b>	<b>11,90</b>

Rendimiento =  $\text{POPs/EV sin termooxidar} \times 100$ , EV: esteroides vegetales.



**DISCUSIÓN GENERAL**  
***GENERAL DISCUSSION***



## **I. Determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en esteroides vegetales.**

### *1.1 Selección de un ingrediente fuente de esteroides vegetales*

Se evalúa la idoneidad de un subproducto de la fabricación de papel, procedente de la pasta de madera de coníferas, como el pino (*tall oil*) y de una mezcla de aceites vegetales para el enriquecimiento en esteroides vegetales (EV) de bebidas a base de zumos de fruta (mandarina, banana y uva) con o sin leche. La principal diferencia entre los EV, que aportan los dos ingredientes seleccionados, es que se presentan en forma libre en el *tall oil* o esterificados en los aceites vegetales.

La normativa Europea con respecto al enriquecimiento con EV permite el enriquecimiento en bebidas de fruta a base de leche y contenidos máximos de 3g por envase o día (Decisión de la Comisión, 2004/336/CE). Sin embargo, otras legislaciones existentes en países como Canadá, Estados Unidos o Nueva Zelanda, autorizan dicho enriquecimiento en bebidas solamente a base de zumo de frutas sin leche. Indicar que estos alimentos se consideran alimentos funcionales que proporcionan distintos componentes potencialmente beneficiosos para la salud y constituyen un buen vehículo para incorporar otros componentes bioactivos (minerales, antioxidantes, etc.) (Bertsias et al., 2005).

Las bebidas utilizadas contienen entre 1,77-1,84 g de EV/100 g de bebida (datos indicados por el fabricante). El contenido total de EV analizado es de 1,28-1,93 g/100g bebida. En todas ellas, el  $\beta$ -sitosterol (1,00-1,46 g/100g) es el más abundante, seguido del campesterol (0,07-0,25 g/100g) y estigmasterol (0,02-0,03 g/100g). Además, en aquellas

bebidas en que se utilizan aceites vegetales para el enriquecimiento también se detecta brassicasterol (0,03-0,04 g/100g). El origen de éste compuesto se puede atribuir a la presencia de aceite de colza en la mezcla de aceites vegetales (Piironen et al., 2000b, Phillips et al., 2002). Entre los fitoesteroles se identifican sitostanol (0,10-0,17 g/100g) y campestanol (0,02- 0,07 g/100g).

Los resultados obtenidos muestran que los aceites vegetales son más ricos en campesterol y campestanol, mientras que el *tall oil* es más rico en sitostanol, tal como se ha indicado previamente (Cantrill and Kawamura, 2008).

Los perfiles de EV que se describen en las muestras enriquecidas con *tall oil* son similares a los descritos en bebidas acuosas elaborados a nivel de laboratorio (Jones et al., 2003, Maki et al., 2003) y margarinas (Heggen et al., 2010) enriquecidas con este ingrediente. En los estudios en que se utilizan aceites vegetales para el enriquecimiento de bebidas a base de zumo de frutas se ha identificado el  $\beta$ -sitosterol como EV mayoritario (Mezine et al., 2003, Devaraj et al., 2004, 2006), al igual que en las bebidas analizadas, si bien las proporciones de campesterol y estigmasterol son superiores a las cuantificadas en el presente trabajo.

Dado que los EV son susceptibles de oxidación y para evaluar el contenido de sus óxidos (POPs) se optimiza un método analítico para la cuantificación de los POPs en las bebidas a base de frutas utilizadas en el presente trabajo.

El contenido total de POPs en las bebidas analizadas preparadas a escala de laboratorio y analizadas inmediatamente después de su recepción, varía entre 580-830  $\mu\text{g}/100$  g bebida. Únicamente se detectan

POPs derivados del  $\beta$ -sitosterol (EV mayoritario) y los valores hallados resultan superiores a los determinados en leche enriquecida (0,3-0,5 g/100 g) con EV donde los POPs – derivados del campesterol y/o  $\beta$ -sitosterol y/o estigmasterol – varían en el intervalo entre 180-218  $\mu\text{g}/100$  g bebida (Soupas et al., 2006, Menéndez-Carreño et al., 2008). Las diferencias en el contenido de POPs se atribuyen al mayor grado de enriquecimiento de las bebidas analizadas en el presente trabajo.

El análisis de los POPs en los ingredientes utilizados para el enriquecimiento de las bebidas es inferior (4,86-7,84  $\mu\text{g}/100$  g ingrediente) (González-Larena et al., 2011) al que se cuantifica en las bebidas formuladas, lo que demuestra la influencia del procesado tecnológico en la oxidación de los EV. Dicho procesado incluye un mezclado a alta velocidad (27.000 rpm), dos etapas de homogenización (150 bares), posterior pasteurización (90°C) y, finalmente, envasado en caliente (80°C).

Los perfiles de POPs identificados en ambos tipos de bebidas (zumo o zumo con leche) son similares independientemente del ingrediente (*tall oil* o aceites vegetales) utilizado para el enriquecimiento. Sólo se identifican derivados del  $\beta$ -sitosterol (7 $\alpha$ / $\beta$ -hidroxi,  $\alpha$ / $\beta$ -epoxi y 7-ceto). El orden, en general es ( $\mu\text{g}/100\text{g}$  de bebida): 7 $\beta$ -hidroxisitosterol (311-465) seguido de 7-cetositosterol (108-189),  $\beta$ -epoxisitosterol (32-197), 7 $\alpha$ -hidroxisitosterol (50-91) y  $\alpha$ -epoxisitosterol (38-64). La identificación de estos compuestos es concordante con el perfil de derivados oxidados del  $\beta$ -sitosterol identificado en muestras de leche enriquecida, si bien, aquí también se identifican derivados del campesterol y estigmasterol (Menéndez-Carreño et al., 2008).

No se observan diferencias en el grado de oxidación del  $\beta$ -sitosterol independientemente de la forma química en la que se encuentran en el ingrediente utilizado para el enriquecimiento de las bebidas. Sin embargo, en una matriz de tripalmitina sometida a temperaturas inferiores a 100°C durante un tiempo inferior a 24h, se observa una menor oxidación de las formas libres de  $\beta$ -sitosterol y campesterol en comparación con sus formas esterificadas, invirtiéndose la pauta observada a temperaturas de 180°C (Soupas et al., 2005).

En términos generales el porcentaje de oxidación de EV en las bebidas analizadas es del 0,07%, superior al calculado en los ingredientes utilizados para el enriquecimiento (0,000046%) (González-Larena et al., 2011). El porcentaje de oxidación en las bebidas analizadas es similar a los indicados (0,04-0,09%) en leches enriquecidas (Soupas et al., 2006, Menéndez-Carreño et al., 2008).

Aunque desde un punto de vista biológico, ambos ingredientes (*tall oil* y aceites vegetales) reducen el colesterol asociado a lipoproteínas LDL (Clifton et al., 2008, Heggen et al., 2010), se selecciona como fuente de EV para la formulación posterior de bebidas a utilizar en el ensayo de intervención clínica, el *tall oil*. Este ingrediente permite una mejor cuantificación (disminución en la formación de emulsiones y mejor reproducibilidad en ambas matrices (zumo y zumo leche)) de los EV en las bebidas a las que se ha adicionado.

El aporte de EV en forma libre (procedentes del *tall oil*) es potencialmente susceptible de oxidación durante el procesado tecnológico de las bebidas formuladas y, dado que estas bebidas son utilizadas en estudios de biodisponibilidad de EV, se evalúa la estabilidad de estos



durante el periodo de intervención, mostrando que el contenido de EV (y su perfil) se mantiene constante durante el periodo de intervención. Estos resultados indican que la presencia de  $\beta$ -criptoxantina en estas bebidas a base de zumo de frutas y leche no influye ni en la estabilidad de los EV ni en el perfil de los mismos.

Señalar en las bebidas la presencia de epóxidos que no se detectan en los ingredientes utilizados en el enriquecimiento, lo que sugiere su formación a partir de la conversión del triol mediante deshidratación y/o la epoxidación del  $\beta$ -sitosterol, posiblemente derivada del procesado tecnológico. Los bajos porcentajes de oxidación estimados para los EV en estas bebidas de fruta (con o sin leche) enriquecidas con *tall oil* ponen de manifiesto la idoneidad de este tipo de alimentos como vehículos de EV.

### *1.2 Bioaccesibilidad de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche*

Un requisito para que los componentes de los alimentos puedan ser absorbidos y/o llevar a cabo su efecto biológico es que sean solubles tras el proceso de digestión gastrointestinal. Se define la bioaccesibilidad como la fracción de un compuesto que se libera de la matriz en la que se encuentra y se solubiliza para ser absorbida en el tracto gastrointestinal. Este parámetro se expresa como el porcentaje de la relación entre el contenido del componente en la fracción soluble tras el proceso de digestión y contenido en el alimento. En el presente trabajo las bebidas de fruta se han sometido a un proceso de digestión gastrointestinal simulada en tres etapas: salivar ( $\alpha$ -amilasa, pH 6,5), gástrica (pepsina, pH 1,07) e intestinal (duodenal (pancreatina, pH 7,8), biliar (extracto biliar, pH 8,0)

con taurocolato sódico, colesterol esterasa, lipasa, colipasa y fosfolipasa A<sub>2</sub>) (Granado et al., 2007).

El contenido total de EV en las bebidas objeto de estudio se sitúa entre 607,1 y 743,1 mg/100 g de bebida y en la fracción bioaccesible entre 19,45 y 39,36 mg/100 g bebida. En todos los casos, el orden de abundancia de los EV es:  $\beta$ -sitosterol > sitostanol > campesterol > estigmasterol > campestanol. La BA de los EV en función de la matriz considerada sigue el orden: FbMb (bebida a base de zumo de frutas y leche) (6,5%) > FbMa (bebida a base de zumo de frutas (rico en  $\beta$ -criptoxantina) y leche) (4,4%) > Fb (zumo de frutas (rico en  $\beta$ -criptoxantina)) (3,1%) > M (leche) (2,6%). Al considerar los EV de modo individual, el campesterol y campestanol presentan la mayor BA (3,8-8,3%), seguido de  $\beta$ -sitosterol, sitostanol y estigmasterol (2,5-6,4%). En todos los casos, los valores de BA calculados son muy inferiores en relación a los de colesterol (53,3-98,9%).

Los bajos valores de BA de los EV puede atribuirse a su escasa incorporación en la fase acuosa (Ikeda et al., 1988, Hamada et al., 2006, Matsuoka et al., 2008) durante el proceso de digestión simulada. La mayor incorporación del campesterol, en relación al  $\beta$ -sitosterol, en la fase acuosa se atribuye a la menor longitud de la cadena lateral en posición 24 (metil para el campesterol y etil para el  $\beta$ -sitosterol) (Matsuoka et al., 2010). La mayor afinidad del colesterol por la fase acuosa en comparación con sus análogos vegetales (Hamada et al., 2006, Matsuoka et al., 2008, 2010, Goncalves et al., 2011), explicaría los valores superiores de BA del colesterol frente a los EV. Estudios de solubilidad en emulsiones aceite-agua sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*, han señalado que es la

etapa de lipólisis en la liberación y transferencia de EV y otras moléculas lipófilas (Vitamina D y Coenzima-Q) a la fase acuosa, la limitante de su BA (Malaki Nik et al., 2011). La adición de leche en la formulación de las bebidas a base de zumos de frutas incrementa la bioaccesibilidad de los EV, hecho atribuible a su capacidad de liberación de microconstituyentes lipófilos (Baldi and Pinotti, 2008).

La BA es un parámetro estimador de la biodisponibilidad de los componentes alimentarios. Sin embargo, hay que señalar que, estudios *in vitro* con modelos celulares (Fahy et al., 2004, Ito et al., 2012) e *in vivo* con animales (Bhattacharyya, 1981, Igel et al., 2003) y humanos (Heinemann et al., 1993, Lütjohann et al., 1995, Miettinen et al., 2000, Ostlund et al., 2002), han indicado que la absorción de esteroides sigue el mismo orden (colesterol > campesterol >  $\beta$ -sitosterol ~ estigmasterol) que el patrón obtenido en la BA de las bebidas analizadas, sugiriendo que los métodos de digestión *in vitro* podrían ser utilizados como modelos predictivos.

El contenido de POPs en las bebidas objeto de estudio oscila entre 57,5 y 98  $\mu\text{g}/100$  g bebida y únicamente se detectan óxidos de  $\beta$ -sitosterol, siendo, en general, el 7-cetositosterol el más abundante, seguido de 7 $\beta$ -hidroxisitosterol, en las bebidas que contienen  $\beta$ -criptoxantina (FbMa, Fb) o sitostanotriol, en las bebidas sin  $\beta$ -criptoxantina (FbMb, M). En la fracción bioaccesible el contenido de POPs se sitúa entre 18,7-32,8  $\mu\text{g}/100$  g bebida y, en todos los casos, el sitostanotriol es el mayoritario. La BA de los POPs representa valores de en el intervalo 19,1-49,3%, lo que indica una mayor bioaccesibilidad en relación con sus EV precursores, siendo el sitostanotriol el que mayor BA presenta (incluso superior al 100%). Este

hecho, podría explicarse por la ausencia de  $\alpha/\beta$ -epoxisitosterol en la fracción bioaccesible de las bebidas, debido probablemente a la conversión de estos compuestos en sitostanotriol en el medio ácido del jugo gástrico, como se ha descrito para los COPs (Mareker et al., 1988). Esta conversión parece reducirse al formular las bebidas con leche.

Al calcular el porcentaje de oxidación específico para el  $\beta$ -sitosterol en estas bebidas elaboradas a escala industrial, se obtienen valores del 0,017% inferiores a los obtenidos (0,07%) a partir de las bebidas preparadas a escala de laboratorio.

En el caso de los COPs, los contenidos totales oscilan entre 10,4-213,7  $\mu\text{g}/100\text{g}$  bebida, siendo, lógicamente, la bebida a base de zumo (Fb) la que menor contenido presenta. Estos contenidos representan valores de bioaccesibilidad, entre el 2,1-17,0%, que resultan inferiores a los estimados para los POPs. Este hecho es importante dado que en las bebidas formuladas se ha utilizado leche desnatada cuyo contenido de colesterol es inferior a 2 mg/100 g de bebida, lo que pone de manifiesto una mayor oxidación del colesterol en comparación con los EV. De modo general, en las bebidas analizadas, el 7-cetocolesterol constituye el óxido mayoritario, así como la mayor proporción del isómero  $7\beta$ -hidroxi en relación al  $7\alpha$ -hidroxi tanto para POPs como para COPs.

Los resultados obtenidos indican que las bebidas a base de zumo de frutas y leche favorecen la bioaccesibilidad de los EV, pero también la de sus óxidos. La adición de  $\beta$ -criptoxantina en las muestras no afecta la bioaccesibilidad y/o oxidación de  $\beta$ -sitosterol.

## **II. Evaluación de los efectos biológicos inducidos por los 7-cetosteroles**

Los mecanismos moleculares de absorción de POPs y sus efectos biológicos en el epitelio intestinal, primera barrera fisiológica para la absorción de los POPs que desempeña un papel crítico en la activación y severidad de los procesos de inflamación y respuesta inmune, no son bien conocidos hasta el momento.

El empleo de la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal ha permitido el estudio comparativo de los efectos biológicos de 7-cetoestigmasterol frente a 7-cetocolesterol. Se han realizado estudios preliminares con células HepG2 modelo de adenocarcinoma hepático.

### *2.1 Citotoxicidad*

En los estudios llevados a cabo se evidencia que, tanto el 7-cetoestigmasterol como el 7-cetocolesterol, ejercen su acción citotóxica alterando principalmente la funcionalidad fisiológica del compartimento mitocondrial, a pesar que también pueden acumularse en el compartimento endo/lisosomal. Además, el tiempo de exposición parece influir en el inicio y desarrollo de los efectos citotóxicos causados en la integridad mitocondrial, alterando su potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) o su actividad metabólica. Este hecho puede explicarse considerando como hipótesis la inserción de los óxidos de esteroides en las membranas fosfolípídicas de los compartimentos mitocondrial y/o lisosomal (Roussi et al., 2007).

Los efectos de los 7-cetoesteroides estudiados se han podido asociar a la capacidad celular para producir equivalentes reductores y ATP, así

como a alteraciones de la homeostasis del calcio intracelular ( $[Ca]_i$ ). Al igual que estudios previos utilizando otras líneas celulares (monocitos y/o hepatocitos) (Maguire et al., 2003, Ryan et al., 2005) se ha demostrado la mayor severidad de los efectos causados por los derivados del colesterol. El estudio de las alteraciones en el  $\Delta\Psi_m$  en condiciones de estrés donde se altera la producción de ATP no muestra diferencias entre los efectos citotóxicos de ambos compuestos, si bien, dicha diferencia resulta significativa al incidir en los niveles de  $[Ca]_i$  (bradiquinina) y, marcadamente diferente al inhibir la producción de equivalentes reductores (NADH/FADH<sub>2</sub>) (rotenona). A partir de este hecho podemos hipotetizar que la inserción de los 7-cetoesteroles en la membrana mitocondrial ocurre como consecuencia de largos periodos de exposición, pero en exposiciones agudas o subcrónicas el principal mecanismo es de alteración metabólica. Estudios de citotoxicidad en monocitos (U937) han demostrado que el 7-cetoestigmasterol tiene un efecto negativo en la actividad enzimática (test MTT) mitocondrial, pero no detectan alteraciones en la permeabilidad de membranas celulares a componentes como diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (O'Callaghan et al., 2010).

Las pérdidas en  $\Delta\Psi_m$  (5%) en los cultivos celulares (Caco-2) expuestos a 7-cetoestigmasterol (120  $\mu$ M) son menores que las indicadas por otros estudios para el 7 $\beta$ -hidroxisitosterol (60  $\mu$ M) (18-48%) (Roussi et al., 2007), lo que parece indicar que diferencias estructurales también condicionan la intensidad del efecto tóxico observado.

La severidad de los efectos citotóxicos se han asociado a la aparición de procesos apoptóticos o no (Roussi et al., 2005, 2007), si bien, no se

detecta incremento en la población subdiploide (fase sub-G<sub>1</sub>) celular al cuantificar el ADN en células Caco-2 expuestas a 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol. Este hecho sugiere que no se desencadenan procesos apoptóticos en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Al mismo tiempo, no se detectan alteraciones significativas en las distintas etapas de proliferación (fase S) o división (G<sub>2</sub>/M) celular. Esta ausencia de cambios en procesos biológicos esenciales de la célula se acompaña de un marcado efecto negativo en la funcionalidad mitocondrial, hecho a partir del cual se puede hipotetizar que los efectos tóxicos ocurren por una inhibición metabólica, más que por activación de receptores de membrana o nucleares. Las alteraciones metabólicas se agravarían progresivamente con la acumulación de metabolitos dando lugar a la activación de procesos de apoptosis celular. Para el 7-cetocolesterol los estudios de cuantificación del contenido relativo de ARN en las distintas fases del ciclo celular muestran la menor proporción de ARN en células en fase G<sub>1</sub> y el consiguiente incremento en aquellas en fase G<sub>2</sub> del ciclo celular. Los resultados sugieren distintas respuestas de adaptación celular en función del compuesto considerado. Estos resultados serían coincidentes con los obtenidos en monocitos (U937) expuestos a 7-cetoestigmasterol en los que no se ha detectado incremento en la actividad de las vías de las caspasas (caspasa-3) principales efectores apoptóticos (O'Callaghan et al., 2010), contrariamente al efecto causado por el 7 $\beta$ -hidroxistosterol en Caco-2 (caspasa 3 y 9) (Roussi et al., 2005).

La similitud estructural entre el 7-cetoestigmasterol y 7-cetocolesterol hace presuponer la potencial interacción entre estos compuestos en dos sentidos posibles, 1) negativo de modo competitivo por los distintos

sistemas de internalización y/o metabolismo celular que disminuiría su toxicidad y, 2) positivo por sobreacumulación intracelular presentándose efectos aditivos o sinérgicos e incrementando la severidad de los efectos citotóxicos. La exposición de Caco-2 a 7-cetoesteroles indica una interacción negativa entre ambos compuestos lo que reduce la toxicidad del 7-cetocolesterol a nivel de funcionalidad y polaridad mitocondrial. Este último hecho se observa también para el estigmasterol.

Los estudios preliminares ( $\Delta\Psi_m$ ) llevados a cabo en hepatocitos demuestran la mayor susceptibilidad de esta línea celular a los efectos citotóxicos de 7-cetoestigmasterol y 7-cetocolesterol con respecto a los observados en la línea Caco-2. Además, también evidencian la interacción negativa entre 7-cetoestigmasterol y 7-cetocolesterol reduciéndose la citotoxicidad del 7-cetocolesterol.

## *2.2 Potencial inflamatorio*

Los efectos biológicos causados por los 7-cetoesteroles se evalúan en el desarrollo de procesos inflamatorios en el epitelio intestinal dado que las citoquinas son proteínas esenciales para comunicación intercelular. La inflamación es un proceso fisiológico que no sólo se desencadena frente al daño o infección sino también frente a componentes alimentarios y estímulos ambientales.

Las citoquinas son producidas principalmente por el sistema inmune, y, además, en menor medida, por las células endoteliales, epiteliales, adipocitos y las del tejido conjuntivo implicadas en el desarrollo de procesos ateroscleróticos. Son moléculas señalizadoras que controlan diversas funciones fisiológicas tales como: diferenciación y maduración

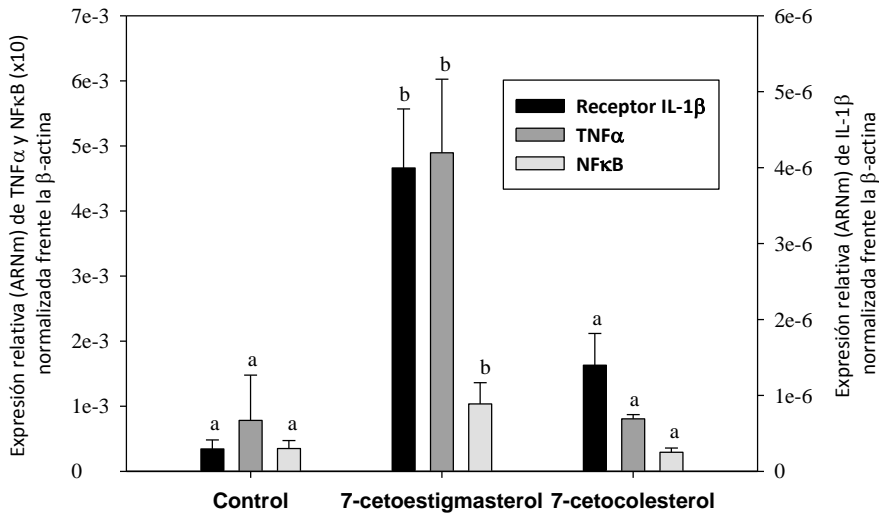


celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y otros procesos biológicos. Las citoquinas seleccionadas para el estudio incluyen inductores de procesos inflamatorios y reguladores de permeabilidad intestinal (TNF $\alpha$ ), acción pirógena y activadora de células T-“helper” efectoras en los procesos de inflamación intestinal (IL-1 $\beta$ ), quimiotáctica y activadora de neutrófilos (IL-8), inmunosupresoras e antiinflamatoria (IL-10) (Fitzgerald et al., 2001).

Los resultados obtenidos evidencian el mayor potencial inflamatorio del 7-cetoestigmasterol frente al 7-cetocolesterol, al estar ambos presentes en la misma concentración. El 7-cetoestigmasterol induce la producción de TNF $\alpha$ , IL-8 e IL-10, mientras que el 7-cetocolesterol sólo incrementa la producción de IL-8. Este último hecho evidencia el elevado potencial aterosclerótico del 7-cetocolesterol. Esta inducción de IL-8 no se asocia a incrementos de expresión (ARNm) del NF $\kappa$ B, lo que sugiere un mecanismo molecular auxiliar a la vía de las proteínas quinasas mitógenas activadas (MAPK) (van de Walle et al., 2008) (**figura nº 17**) (datos no recogidos en las publicaciones). Recientemente se ha demostrado el menor potencial en la inducción de IL-8 del 7-cetocolesterol en comparación con otros derivados oxidados del colesterol (Mascia et al., 2010).

La inducción de biomarcadores proinflamatorios como el TNF $\alpha$  y el receptor IL-1 $\beta$  que favorecen una mayor permeabilidad tisular e infiltración linfocitaria hace suponer una mayor interacción del 7-cetoestigmasterol con el sistema inmune innato y la potencial activación de macrófagos en el desarrollo de la placa aterosclerótica.

Figura nº 17. Expresión (ARNm) relativa del receptor de IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y factor de transcripción nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) en células Caco-2 expuestas a 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los diferentes biomarcadores de inflamación (receptor IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B) expuestos a 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol ( $n = 5$ ).

### 2.3 Absorción y metabolismo

Dado el diferente efecto citotóxico o inflamatorio observado por los 7-cetoesteroles estudiados, es de interés profundizar en el mecanismo específico por el cual estos compuestos ejercen sus efectos biológicos. Los estudios llevados a cabo comparan los efectos de 7-cetoestigmasterol y 7-cetocolesterol en la expresión (ARNm) de 1) los potenciales sistemas de captación (NCP1L1) y secreción (transportadores ABCG5/8) identificados

hasta el momento para la absorción de los óxidos de esteroides, y 2) enzimas críticas en la homeostasis lipídica y/o del colesterol (HMGCoA, ACAT).

En los cultivos celulares (células Caco-2) expuestos a ambos 7-cetoesteroides no se detectan cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en la expresión de NCP1L1 ni ABCG5/8. La participación de NCP1L1 en la absorción de 7-cetoesteroides sugiere un mecanismo adicional a los potenciales procesos de difusión pasiva, que serían estos en base a los que se explicarían las alteraciones observadas en la funcionalidad mitocondrial y conversión de MTT. El efecto de ambos compuestos se ha asociado con diferentes vías intracelulares de transducción mediante el uso de inhibidores (oligomicina, bradiquinina, rotenona) capaces de alterar la homeostasis celular. La internalización celular de 7-cetoestigmasterol aumenta por desequilibrios en la homeostasis del  $[Ca]_i$  y concentración de equivalentes reductores (NADH/FADH<sub>2</sub>). Este hecho se explica por el incremento en los valores de expresión del canal NCP1L1 que se ha asociado con una mayor concentración de esta proteína (Chen et al., 2011). La hipótesis indicada es coherente con la mayor alteración del  $\Delta\Psi_m$  en los cultivos pretratados con bradiquinina o rotenona señalada en los estudios de citotoxicidad. En ningún caso se observan incrementos en la expresión de los transportadores ABCG5/8, hecho acorde con la ausencia de interacción de mezclas de POPs (7 $\alpha$ / $\beta$ -hidroxi,  $\alpha$ / $\beta$ -epoxi y 7-cetoderivados) del  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol con el LXR, regulador de los transportadores ABC en células Caco-2 (Plat and Mensink, 2005). Resultados similares se indican en estudios con modelos animales (hámsters) (Liang et al., 2011).

En cuanto a los enzimas implicados en la homeostasis lipídica y/o del colesterol, la exposición de los cultivos celulares a 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol induce un incremento en los niveles de expresión de la HMGC<sub>o</sub>A. Este efecto puede deberse a la respuesta celular como consecuencia de la inhibición de este enzima (Brown and Jessup, 2009). El hecho que los cultivos, pretratados con bradiquinina, presenten una mayor expresión de HMGC<sub>o</sub>A al incubarse con 7-cetoestigmasterol, sugiere que este compuesto presenta un mecanismo de regulación adicional a la [Ca]<sub>i</sub>. El calcio intracelular participa en el mecanismo de control de la proteína quinasa dependiente de calmodulina favoreciendo la forma inactiva de la HMGC<sub>o</sub>A (Stryer, 2007).

En los cultivos control (no tratados con inhibidores) no se observan cambios en la expresión de la ACAT, lo que justifica la baja absorción de estos compuestos dado que no se activa la enzima responsable de su esterificación y para la inserción en los quilomicrones. Un efecto similar ha sido descrito en un modelo animal utilizando hámsters alimentados con una mezcla de óxidos de estigmasterol o β-sitosterol) (0,1% p/p dieta, durante 6 semanas) (Liang et al., 2011). Contrariamente, la preincubación de los cultivos con los inhibidores inducen una represión significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de expresión de dicho enzima, excepto en las células pretratadas con oligomicina e incubadas con 7-cetocolesterol, lo que indica la importancia de los equivalentes reductores y energía metabólica en la esterificación intracelular del 7-cetocolesterol. Los diferentes efectos observados para este enzima, evidencian la alta especificidad de la ACAT en el metabolismo del colesterol, ya que, como se ha indicado previamente, la velocidad de esterificación de los EV es

menor que la del colesterol (Temel et al., 2003, Lin et al., 2010), lo que podría explicar, al menos en parte, la menor regulación de la ACAT en los cultivos incubados con 7-cetocolesterol frente a los expuestos a 7-cetoestigmasterol.



**CONCLUSIONES**

*CONCLUSIONS*





I) Los estudios llevados a cabo para la determinación de esteroides y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas con y sin leche han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1) Se selecciona, como ingrediente para enriquecer en esteroides vegetales las bebidas objeto de estudio elaboradas a escala de laboratorio, un subproducto de la pasta de madera de coníferas “*tall oil*” que contiene esteroides vegetales libres, frente al otro ingrediente estudiado, mezcla de aceites vegetales con esteroides vegetales esterificados. El ingrediente seleccionado facilita el análisis cuantitativo de los esteroides vegetales en las bebidas analizadas.

2) En el ingrediente seleccionado, el perfil de esteroides vegetales sigue el orden:  $\beta$ -sitosterol > sitostanol > campesterol > estigmasterol  $\approx$  campestanol, acorde a la legislación vigente.

3) No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en el perfil y contenido de esteroides vegetales en las dos bebidas a base de zumo de frutas ricas o no en  $\beta$ -criptoxantina y leche, utilizadas en el ensayo de intervención clínica y elaboradas a escala industrial. No se modifica el contenido de esteroides vegetales en las condiciones de almacenamiento (24°C, 4 meses) durante el estudio de intervención.

4) En las bebidas elaboradas tanto a escala de laboratorio como industrial, se detectan 7- $\alpha/\beta$ -hidroxi,  $\alpha/\beta$ -epoxi, 7-cetositosterol, además de sitostanotriol en las bebidas elaboradas a escala industrial. El contenido

total de óxidos de esteroides vegetales aumenta ligeramente durante el periodo de almacenamiento (24°C , 4 meses) en las muestras utilizadas en el estudio de intervención clínica, siendo su grado de oxidación (0,019-0,035%) inferior al de las bebidas elaboradas a escala de laboratorio (0,07%).

5) La bioaccesibilidad de los esteroides vegetales totales oscila entre 2,62 y 6,48%, siendo superior la correspondiente al campesterol-campestanol (3,47-8,31%). En el caso del colesterol, la bioaccesibilidad se sitúa entre 53,34 y 98,96%. Estos hechos son acordes a la absorción *in vivo*.

6) La bioaccesibilidad de los óxidos de esteroides vegetales oscila entre 26,27-54,53% para el 7-cetositosterol y 62,68-176,63% para el sitostanotriol, superior a la correspondiente a sus esteroides vegetales análogos. La mayor bioaccesibilidad del sitostanotriol se atribuye a la conversión de los  $\alpha/\beta$ -epóxidos a formas triol debido a las condiciones ácidas de la digestión gástrica. En el caso de los óxidos de colesterol, solo se detectan 7- $\alpha/\beta$ -hidroxicolesterol y su bioaccesibilidad es inferior, oscila entre 0,58 y 20,66%.

**II)** Los estudios *in vitro* de los efectos biológicos (citotóxicos y moduladores) de los óxidos de esteroides permiten concluir:

7) El 7-cetocolesterol, en células Caco-2 a concentraciones entre 30 y 120  $\mu\text{M}$  y tiempos de incubación de 12 y 24h, presenta efecto citotóxico a

nivel mitocondrial, sin estar asociado a procesos de apoptosis celular. El poder reductor y la síntesis de ATP desempeñan un papel fundamental en este mecanismo de acción. A concentración de 120  $\mu\text{M}$  y 24h de incubación, el 7-cetocolesterol disminuye la proporción relativa de ARN en la fase G1 y aumenta la de G2. En general, el 7-cetoestigmasterol no influye negativamente sobre la funcionalidad metabólica de los compartimentos endo/lisosomal o mitocondrial, ni induce cambios en el contenido de ácidos nucleicos. Su mecanismo de acción se asocia a cambios en la concentración intracelular de calcio.

8) La presencia de estigmasterol o 7-cetoestigmasterol disminuye los efectos citotóxicos causados por el 7-cetocolesterol.

9) El 7-cetoestigmasterol presenta mayor potencial inflamatorio que el 7-cetocolesterol como se deduce del incremento en la síntesis y/o expresión de biomarcadores proinflamatorios ( $\text{TNF}\alpha$ , receptor IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-8).

10) La obtención de óxidos de esteroides vegetales por termooxidación y separación por HPLC es un método que permite obtener 7 $\alpha$ / $\beta$ -hidroxi, triol y 7-cetoderivados, si bien, dada la baja pureza obtenida analíticamente para estos compuestos, es necesario optimizar los parámetros de purificación para su obtención a gran escala. Este hecho se considera de interés para futuros estudios que permitan profundizar en el conocimiento de los efectos biológicos de los óxidos de esteroides vegetales, información actualmente escasa y contradictoria.

I) The studies for the determination of sterols and their oxides in fruit juice and/or milk-based beverages allow the following conclusions to be drawn:

1) A byproduct of wood pulp "*tall oil*" containing free sterols is selected as an ingredient for plant sterol enrichment of beverages prepared on a laboratory scale, compared with the other studied ingredient in the form of a mixture of vegetable oils with esterified plant sterols. The selected ingredient facilitates the quantitative analysis of plant sterols in the analyzed beverage.

2) In the selected ingredient, the plant sterol profile exhibited the following order:  $\beta$ -sitosterol > sitostanol > campesterol > stigmasterol  $\approx$  campestanol, in accordance with current legislation.

3) No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed in the plant sterols profile and contents in the two fruit juices, enriched or not enriched with  $\beta$ -cryptoxanthin, and in the milk-based beverages used in the clinical intervention trial and produced on an industrial scale. No modifications were observed in plant sterols content after storage (4 months, 24°C) during the intervention study.

4) In the laboratory or industrial scale beverages, 7- $\alpha/\beta$ -hydroxy,  $\alpha/\beta$ -epoxy and 7-ketositosterol were detected. Moreover, in the beverages produced on an industrial scale, sitostanetriol was also detectable. In the beverages used in the clinical intervention study, of the total sterol

oxidation product contents increased slightly during the storage period (4 months, 24°C). However, in these beverages lower oxidation states (from 0.019 to 0.035%) were calculated than in those produced on a laboratory scale (0.07%).

5) Total plant sterol bioaccessibility ranged from 2.62-6.48%, being higher for campesterol-campestanol (3.47-8.31%). In the case of cholesterol, bioaccessibility ranged from 53.34-98.96%. These observations are consistent with *in vivo* absorption.

6) Sterol oxidation product bioaccessibility ranged from 26.27-54.53% for 7-ketositosterol and from 62.68-176.63% for sitostanetriol, these values being higher than for the corresponding sterols. The higher bioaccessibility of sitostanetriol is attributed to the conversion of  $\alpha/\beta$ -epoxides to triol forms due to the acidic conditions of the gastric digestion. In the case of cholesterol oxides, only 7- $\alpha/\beta$ -hydroxycholesterol was detected, and its bioaccessibility was lower, ranging from 0.58-20.66%.

**II)** From the *in vitro* studies of the biological effects (cytotoxic and modulators) of sterol oxides, the following can be concluded:

7) Caco-2 cells exposed to 7-ketocholesterol at concentrations between 30 and 120  $\mu\text{M}$  and with incubation times of 12 and 24 h show cytotoxic effects at mitochondrial level, without being associated to cellular apoptotic processes. Reducing power and ATP synthesis play a role in this mechanism of action. At 120  $\mu\text{M}$  and 24 h of exposure, 7-

ketocholesterol decreases the relative proportion of RNA in the G1 phase and increases the proportion in G2. In general, 7-ketostigmasterol neither causes deleterious effects in terms of metabolic function at endosomal / lysosomal or mitochondrial level nor induces changes in nucleic acid content. Its mechanism of action is related to changes in intracellular calcium concentration.

8) The presence of stigmasterol or 7-ketostigmasterol reduces the cytotoxic effects produced by 7-ketocholesterol.

9) 7-ketostigmasterol has a greater proinflammatory potential than 7-ketocholesterol, as deduced from the increased synthesis and/or expression of proinflammatory biomarkers (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  receptor, NF $\kappa$ B, IL-8).

10) Thermal oxidation and separation by HPLC allows obtainment of the 7 $\alpha$ / $\beta$ -hydroxy, triol and 7-ketoderivatives, though the low purity obtained analytically for these compounds indicates that it is necessary to optimize the purification parameters in order to allow their synthesis on a large scale. This fact is considered to be of interest for future studies on the biological effects of plant sterol oxidation products, for which the existing information is scarce and contradictory.

## BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES

- Abramsson-Zetterberg, L., Svensson, M., Johnsson, L. No evidence of genotoxic effect *in vivo* of the phytosterol oxidation products triols and epoxides. *Toxicology Letters*, **2007**, 173, 132-139.

- Adcox, C., Boyd, L., Oehrl, L., Allen, J., Fenner, G. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 2090-2095.

- AESAN, 2012. Los nuevos alimentos / ingredientes alimentarios autorizados en la UE con arreglo al R (CE) 258/1997. [http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/cadena\\_alimentaria/TABLADECISIONES\\_AUTORIZACION\\_NUEVOS\\_ALIMENTOS.pdf](http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/cadena_alimentaria/TABLADECISIONES_AUTORIZACION_NUEVOS_ALIMENTOS.pdf). Actualizado a fecha 24.05.2012, consultado en octubre 2012.

- Ahrens, E.H., and Boucher, C.A. The composition of a simulated American diet. Comparison of chemical analyses and estimates from food composition tables. *Journal of the American Dietetic Association*, **1978**, 73, 613-620.

- Amundsen, A.L., Ntanios, F., Put, N., Ose, L. Long-term compliance and changes in plasma lipids, plant sterols and carotenoids in children and parents with FH consuming plant sterol ester-enriched spread. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2004**, 58, 1612-1620.

- Apprich, S., and Ulberth, F. Gas chromatographic properties of common cholesterol and phytosterol oxidation products. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1055, 169-176.

- Armstrong, M.J., and Carey, M.C. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *Journal of Lipid Research*, **1987**, 28, 1144-1155.

- Aringer, L., and Eneroth, P. Studies on the formation of C7-oxygenated cholesterol and beta-sitosterol metabolites in cell-free preparations of rat liver. *Journal of Lipid Research*, **1973**, 14, 563-572.

- Aringer, L., and Eneroth, P. Formation and metabolism *in vitro* of 5, 6-epoxides of cholesterol and  $\beta$ -sitosterol. *Journal of Lipid Research*, **1974**, 15, 389-398.

- Aringer, L. Conversion of  $7\alpha$ -hydroxycholesterol and  $7\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -sitosterol to  $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy and  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- $5\beta$ -steroids *in vitro*. *Journal of Lipid Research*, **1975**, 16, 426-433.

- Aringer, L., Eneroth, P., Nordstrom, L. Side-chain hydroxylation of cholesterol, campesterol, and beta-sitosterol in rat-liver mitochondria. *Journal of Lipid Research*, **1976**, 17, 263-272.

- Aringer, L. Oxidation of 3-oxygenated  $\Delta^4$ - and  $\Delta^5$ -C27 steroids by soybean lipoxygenase and rat liver microsomes. *Lipids*, **1980**, 15, 563-571.

- Aringer, L., and Nordstrom, L. Side-chain oxidation of monooxygenated C27 and C29-steroids in rat liver mitochondria and 18,000 x g supernatant. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1981**, 655, 13-21.

- Awad, A.B., Chen, Y.C., Fink, C.S., Hennessey, T.  $\beta$ -Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Research*, **1996**, 16, 2797-2804.

- Awad, A.B., Henandez, A.Y.T., Fink, C.S., Mendel, S.L. Effect of dietary phytosterols on cell proliferation and protein kinase C activity in rat colonic mucosa. *Nutrition and Cancer*, **1997**, 27, 210-215.

- Awad, A.B., von Holtz, R.L., Cone, J.P., Fink, C.S., Chen, Y.C.  $\beta$ -Sitosterol inhibits the growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Research*, **1998**, 18, 471-479.



- Awad, A.B., and Fink, C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 2127-2130.
- Awad, A.B., Gan, Y., Fink, C.S. Effect of  $\beta$ -sitosterol, a plant sterol, on growth, protein phosphatase 2A and phospholipid D in LNCaP cells. *Nutrition and Cancer*, **2000a**, 36, 74-78.
- Awad, A.B., Downie, A., Fink, C.S., Kim, U. Dietary phytosterols inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Research*, **2000b**, 20, 821-824.
- Awad, A.B., Fink, C.S., Williams, H., Kim, U. *In vitro* and *in vivo* (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *European Journal of Cancer Prevention*, **2001a**, 10, 507-513.
- Awad, A.B., Downie, A., Fink, C.S., Kim, U. Dietary phytosterols inhibit the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Research*, **2001b**, 20, 821-824.
- Awad, A.B., Williams, H., Fink, C.S. Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2003**, 14, 111-119.
- Awad, A.B., Chinnam, M., Fink, C.S., Bradford, P.G. Targeting ceramide by dietary means to stimulate apoptosis in tumor cells, *Current Topics in Nutraceutical Research*, **2004**, 2, 93-100.
- Awad, A.B., Burr, A.T., Fink, C.S. Effect of resveratrol and  $\beta$ -sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **2005a**, 72, 219-226.
- Awad, A.B., Fink, C.S., Trautwein, E.A., Ntanios, F.Y.  $\beta$ -sitosterol stimulates ceramide metabolism in differentiated Caco2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2005b**, 16, 650-655.

- Awad, A.B., Chinnam, M., Fink, C.S., Bradford, P.G.  $\beta$ -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*, **2007**, 14, 747-754.

- Awad, A.B., Barta, S.L., Fink, C.S., Bradford, P.G.  $\beta$ -Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2008**, 52, 419-426.

- Azadmard-Damirchi, S., and Dutta, P.C. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 36-42.

- Baker, V.A., Hepburn, P.A., Kennedy, S.J., Jones, P.A., Lea, L.J., Sumpter, J.P., Ashby, J. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of *in vivo* and *in vitro* assays. *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37, 13-22.

- Baldi, A., and Pinotti, L. Lipophilic microconstituents of milk. *Bioactive Components of Milk*, **2008**, 606, 109-125.

- Bang, H.J., Arakawa, C., Takada, M., Sato, M., Imaizumi, K. A comparison of the potential unfavourable effects of oxysterol and oxyphytosterol in mice: different effects on cerebral 24S-hydroxycholesterol and serum. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, **2008**, 72, 3128-3133.

- Bañuls, C., Martínez-Triguero, M.L., López-Ruiz, A., Morillas, C., Lacomba, R., Víctor, V.M., Rocha, M., Hernández-Mijares, A. Evaluation of cardiovascular risk and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic subjects on a standard healthy diet including low-fat milk enriched with plant sterols. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2010**, 21, 881-886.

- Barberá, R., and Farré, R. Bioavailability of trace-elements-review. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **1992**, 32, 381- 399.

- Barnsteiner, A., Libinus, T., di Gianvito, A., Schmid, W., Engel, K.H. GC-based analysis of plant stanyl fatty acid esters in enriched foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 5204-5214.
- Bartnikowska, E. Biological activities of phytosterols with particular attention to their effects on lipid metabolism. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **2009**, 59, 105-112.
- Batta, A.K., Xua, G., Bollineni, J.S., Shefera, S., Salen, G. Effect of high plant sterol-enriched diet and cholesterol absorption inhibitor, SCH 58235, on plant sterol absorption and plasma concentrations in hypercholesterolemic wild-type Kyoto rats. *Metabolism Clinical and Experimental*, **2005**, 54, 38-48.
- Baumgartner, S., Mensink, R.P., Husche, C., Lütjohann, D., Plat, J. Effects of plant sterol- or stanol-enriched margarine on fasting plasma oxyphytosterol concentrations in healthy subjects. *Atherosclerosis*, **2013**, *In Press*.
- Benito, P., and Miller, D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition Research*, **1998**, 18, 581-603.
- Bertias, G., Linardakis, M., Mammias, I., Kafatos, A. Fruit and vegetables consumption in relation to health and diet of medical students in Crete, Greece. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **2005**, 75, 107-117.
- Bhattacharyya, A.K. Uptake and esterification of plant sterols by rat small intestine. *American Journal of Physiology*, **1981**, 240, G50-G55.
- Bhattacharyya, A.K., and Eggen, D.A. Absorbability of plant sterols in the rhesus monkeys. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **1981**, 25, 85-89.
- Boberg, K.M., Lund, E., Olund, J., Björkhem, I. Formation of C21 bile acids from plant sterols in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, **1990**, 265, 7967-7975.
- Bohn, T., Tian, Q., Chitchumroonchokchai, C., Failla, M.L., Schwartz, S.J., Cotter, R., Waksman, J.A. Supplementation of test meals with fat-free phytosterol products can reduce cholesterol micellarization during simulated

digestion and cholesterol accumulation by Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 267-272.

- Bortolomeazzi, R., Cordano, F., Pizzale, L., Conte, L.S. Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 2394-2401.

- Boselli, E., Velazco, V., Caboni, M.F., Lercker, G. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 917, 239-244.

- Bouic, P.J.D., Etsebeth, S., Liebenberg, R.W., Albrecht, C.F., Pegel, K., Van Jaarsveld, P.P. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *International Journal of Immunopharmacology*, **1996**, 18, 693-700.

- Bouic, P.J.D. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **2001**, 4, 471-475.

- Bradford, P.G., and Awad, A.B. Phytosterols as anticancer compounds. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2007**, 51, 161-170.

- Bradford, P.G., and Awad, A.B. Modulation of signal transduction in cancer cells by phytosterols. *Biofactors*, **2010**, 36, 241-247.

- Brooks, C.J.W., McKenna, R.M., Cole, W.J., Maclachlan, J., Lawric, T.D.V. "Profile" Analysis of oxygenated sterols in plasma and serum. *Biochemical Society Transactions*, **1983**, 11, 700-701.

- Brown, A.J., Watts, G.F., Burnett, J.R., Dean, R.T., Jessup, W. Sterol 27 hydroxylase acts on 7-ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture. *Journal of Biological Chemistry*, **2000**, 275, 27627-27633.

- Brown, A.J., and Jessup, W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, **2009**, 30, 111-122.

- Brufau, G., Quílez, J., Canela, M.A., Salas-Salva, J., Bulló, M., Rafecas, M. Evaluation of lipid oxidation after ingestion of bakery products enriched with phytosterols,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol. *Clinical Nutrition*, **2004**, 23, 1390-1397.

- Brufau, G., Kuipers, F., Lin, Y., Trautwein, E.A., Groen, A.K. A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS ONE*, **2011**, 6, e21576.

- Brüll, F., Mensink, R.P., Plat, J. Plant sterols: functional lipids in immune function and inflammation. *Clinical Lipidology*, **2009**, 4, 355-365.

- Cai, X., Shen, Y.L., Zhu, Q., Jia, P.M., Zhou, L., Huang, Y., Zhang, J.W., Xiong, S.M., Chen, S.J., Wang, Z.Y., Chen, Z., Chen, G.Q. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, **2000**, 14, 262-270.

- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J.C., Benítez, S., Bancells, C., González-Sastre, F., Palomer, X., Blanco-Vaca, F. Dietary phytosterols modulate T-helper immune response but do not induce apparent anti-inflammatory effects in a mouse model of acute, aseptic inflammation. *Life Sciences*, **2007**, 80, 1951-1956.

- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J.C., Blanco-Vaca, F., New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, **2009**, 205, 18-31.

- Cantrill, R., and Kawamura, Y. Phytosterols, phytostanols and their esters. Chemical and Technical Assessment for the 69th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2008, (consultado noviembre 2012). <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/69/Phytosterols.pdf>.

- Casas-Agustench, P., Serra, M., Pérez-Heras, A., Cofá, M., Pintó, X., Tratwein, E.A., Ros, E. Effects of plant sterol esters in skimmed milk and vegetable-fat-enriched milk on serum lipids and non-cholesterol sterols in hypercholesterolaemic subjects: a randomised, placebo-controlled, crossover study. *British Journal of Nutrition*, **2012**, 107, 1766-1775.

- Cercaci, L., Conchillo, A., Rodriguez-Estrada, M.T., Ansorena, D., Astiasarán, I., Lercker, G. Preliminary study on health-related lipid components of bakery products. *Journal of Food Protection*, **2006**, 69, 1393-1401.

- Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M.T., Lercker, G., Decker, E.A. Phytosterol oxidation in oil-in water emulsions and bulk oil. *Food Chemistry*, **2007**, 102, 161-167.

- Cerqueira, M.T., McCurry Fry, M., Connor, W.E. The food and nutrient intakes of the Tarahumara Indians of Mexico. *American Journal of International Nutrition*, **1979**, 32, 905-915.

- Chaurasia, N., Wichtl, M. Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *Journal of Natural Products*, **1987**, 50, 881-885.

- Chen, J., Li, Q., Zhang, Y., Yang, P., Zong, Y., Qu, S., Liu, Z. Oleic acid decreases the expression of a cholesterol transport-related protein (NPC1L1) by the induction of endoplasmic reticulum stress in Caco-2 cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **2011**, 67, 153-163.

- Cheng, Y.W., Kang, J.J., Shih, Y.L., Lo, Y.L., Wang, C.F. Cholesterol-3- $\beta$ , 5- $\alpha$ , 6- $\beta$ -triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food and Chemical Toxicology*, **2005**, 43, 617-622.

- Choi, Y.H., Kong, K.R., Kin, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, S.H., Park, K.Y. Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, **2003**, 23, 1657-1662.

- Christiansen, L., Karjalainen, M., Serimaa, R., Lörnroth, N., Paakkari, T., Yliruusi, J. Phase behaviour of  $\beta$ -sitosterol-cholesterol and  $\beta$ -sitostanol-cholesterol co-precipitates. *S.T.P. Pharma Sciences*, **2001**, 11, 167-173.
- Christianson-Heiska, I., Smeds, P., Granholm, N., Bergelin, E., Isomaa, B. Endocrine modulating actions of a phytosterol mixture and its oxidation products in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **2007**, 145, 518-527.
- Clement, L.M., Hansen, S.L., Costin, C.D., Perri, G.L. Quantitation of sterols and sterol esters in fortified foods and beverages by GC/FID. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2010**, 87, 973-980.
- Clifton, P.M., Noakes, M., Sullivan, D., Erichsen, N., Ross, D., Annison, G., Fassoulakis, A., Cehun, M., Nestel, P. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2004**, 58, 503-509.
- Clifton, P.M., Mano, M., Duchateau, G.S.M.J.E., van der Knaap, H.C.M., Trautwein, E.A. Dose-response effects of different plant sterol sources in fat spreads on serum lipids and C-reactive protein and on the kinetic behavior of serum plant sterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2008**, 62, 968-977.
- Conchillo, A., Cercaci, L., Ansorena, D., Rodriguez-Estrada, M.T., Lercker, G., Astiasarán, I. Levels of phytosterol oxides in enriched and nonenriched spreads: application of a thin-layer chromatography-gas chromatography methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 7844-7850.
- Contarini, G., Povolo, M., Bonfitto, E., Berardi, S. Quantitative analysis of sterols in dairy products: experiences and remarks. *International Dairy Journal*, **2002**, 12, 573-578.

- Crews, H.M., Burrell, J.A., McWeeny, D.J. Preliminary enzymolysis studies on trace element extractability from food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1983**, 34, 997-1004.

- Darzynkiewicz, Z. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content. *Methods in Cell Biology*, **1994**, 41, 401-420.

- Day, A.J., and Williamson, G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *British Journal of Nutrition*, **2001**, 86, S105-S110.

- De Jong, A., Plat, J., Mensink, R.P. Metabolic effects of plant sterols and stanols. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2003**, 14, 362-369.

- De Jong, A., Plat, J., Bast, A., Godschalk, R.W.L., Basu, S., Mensink, R.P. Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2008**, 62, 263-273.

- De Smet, E., Mensink, R.P., Plat, J. Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: Suggested mechanisms from past to present. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2012**, 56, 1058-1072.

- De Stefani, E., Brennan, P., Boffetta, P., Ronco, A.L., Mendilaharsu, M., Deneo-Pellegrini, H. Vegetables, fruits related dietary antioxidants, and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: A case-control study in Uruguay. *Nutrition and Cancer*, **2000a**, 38, 23-29.

- De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A.L., Brennan, P., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J.C., Mendilaharsu, M. Plant sterols and risk of stomach cancer: A case-control study in Uruguay. *Nutrition and Cancer*, **2000b**, 37, 140-144.

- De Vries, J.H.M., Jansen, A., Kromhout, D., van de Bovenkamp, P., van Staveren, W.A., Mensink, R.P., Katan, M.B. The fatty acid and sterol content of



food composites of middle-aged in seven countries. *Journal of Food Composition and Analysis*, **1997**, 10, 115-141.

- Decisión de la Comisión 2000/500/CE de 24 de julio de **2000** relativa a la autorización de la comercialización de las «grasas amarillas de untar con ésteres de fitosterol» como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L200/59, 8.8.2000.

- Decisión de la Comisión 2004/333/CE de 31 de marzo de **2004** relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, aliños para ensaladas, productos de tipo leche, productos de tipo leche fermentada, bebidas de soja y productos tipo queso con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L105/40, 14.4.2004.

- Decisión de la Comisión 2004/334/CE de 31 de marzo de **2004** relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, productos tipo leche, productos tipo yogur y salsas aromáticas con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L105/43, 14.4.2004.

- Decisión de la Comisión 2004/335/CE de 31 de marzo de **2004** relativa a la autorización de comercialización de productos tipo leche y productos tipo yogur con ésteres de fitosterol añadidos como nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L105/46, 14.4.2004.

- Decisión de la Comisión 2004/336/CE de 31 de marzo de **2004** relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, bebidas de fruta a base de leche, productos tipo yogur y productos tipo queso, con

fitosteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo *Diario Oficial de la Unión Europea*, L105/49, 14.4.2004.

- Decisión de la Comisión 2004/845/CE de 12 de noviembre de **2004** relativa a la autorización de la comercialización de bebidas a base de leche con fitosteroles/fitoestanoles añadidos como nuevos alimentos o nuevos ingredientes alimentarios con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L336/14. 11.12.2004.

- Decisión de la Comisión 2006/58/CE de 24 de enero de **2006** por la que se autoriza la comercialización de pan de centeno con fitosteroles/fitoestanoles añadidos como nuevos alimentos o nuevos ingredientes alimentarios de conformidad con el Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L31/18, 3.2.2006.

- Decisión de la Comisión 2007/343/CE de 15 de mayo de **2007** por la que se autoriza la comercialización de aceite enriquecido con fitosteroles o fitoestanoles como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L129/63, 17.5.2007.

- Decisión de la Comisión 2008/36/CE de 10 de enero de **2008** por la que se autoriza la comercialización de bebidas de arroz con fitosteroles o fitoestanoles añadidos como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L8/15, 11.1.2008.

- Delimaris, I., Faviou, E., Antonakos, G., Stathopoulou, E., Zachari, A., Dionyssiou-Asteriou, A. Oxidized LDL, serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer. *Clinical Biochemistry*, **2007**, 40, 1129-1134.

- Derdemezis, C.S., Filippatos, T.D., Mikhailidis, D.P., Elisaf, M.S. Effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, **2010**, 15, 120-134.

- Derewiaka, D., and Obiedzinski, M. Phytosterol oxides content in selected thermally processed products. *European Food Research and Technology*, **2012**, 234, 703-712.

- Devaraj, S., Jialal, I., Vega-López, S. Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **2004**, 24, 25-28.

- Devaraj, S., Autret, B., Jialal, I. Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2006**, 84, 756-761.

- Devaraj, S., Jialal, I., Rockwood, J., Zak, D. Effect of orange juice and beverage with phytosterols on cytokines and PAI-1 activity. *Clinical Nutrition*, **2011**, 30, 668-671.

- Dévoli, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Lucarini, M., Lombardi-Boccia, G., Nicoli, S., Piironen, V. Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2006**, 50, 818-823.

- Diczfalusy, U. Analysis of cholesterol oxidation products in biological samples. *Journal of AOAC International*, **2004**, 87, 467-473.

- Doornbos, A., Meynen, E.M., Duchateau, G.S.M.J.E., van der Knaap, H.C.M., Trautwein, E.A. Intake occasion affects the serum cholesterol lowering of a plant sterol-enriched single-dose yoghurt drink in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2006**, 60, 325-333.

- Downie, A., Fink S.C., Awad, A.B. Effect of phytosterols on MDA-MB-231 human breast cancer cell growth. *FASEB Journal*, **1999**, 13, A333.

- Dutta, P.C., and Appelqvist, L.A. Sterols and sterol oxides in the potato products, and sterols in the vegetable oils used for industrial frying operations. *Grasas y Aceites*, **1996**, 47, 38-47.

- Dutta, P.C. Studies on phytosterol oxides II. Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1997**, 74, 659-666.

- Dutta, P.C., and Appelqvist, L.A. Studies on phytosterol oxides: 1. Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1997**, 74, 647-657.

- Ekmekcioglu, C., Strauss-Blasche, G., Leibetseder, V.J. Toxicological and biochemical effects of different beverages on human intestinal cells. *Food Research International*, **1999**, 32, 421-427.

- Ekmekcioglu, C. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, **2002**, 76, 225-230.

- Eneroth, P., Hellström, K., Ryhage, R. Identification and quantification of neutral fecal steroids by gas-liquid chromatography and mass spectrometry: studies of human excretion during two dietary regimens. *Journal of Lipid Research*, **1964**, 5, 245-262.

- Engel, R., Johannes, C., Rubic, T., Walz, E., Lorenz, R., Schubert, H., Schuchmann, H.P. Pflanzliche wirkstoffe im kampf gegen hohe cholesterolspiegel: Freie phytosterole-neue wirkstoffe mit hohen anforderungen an die technische formulierung. *Chemie Ingenieur Technik*, **2005**, 77, 1184-1185.

- Escuriol, V., Marí-Dell'Olmo, M., Rohlfs, I., Borrell, C., Chirlaque, D., Buckland, G., Rodríguez, L., Sánchez, M.J., Amiano, P., Egüés, N., Ros, E. Plant

sterol intake and education level in the Spanish EPIC cohort. *Nutrition*, **2009**, *25*, 769-773.

- Fahy, D.M., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, N.M. Phytosterols: lack of cytotoxicity uptake in Caco-2 cells in culture. *Food Additives and Contaminants*, **2004**, *21*, 42-51.

- Fairweather-Tait, S.J. Bioavailability of trace elements. *Food Chemistry*, **1992**, *43*, 213-217.

- Fairweather-Tait, S.J. Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutrition Research Reviews*, **1996**, *9*, 295.

- FAO OMS. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization joint expert consultation. Processing and refining edible oils. Fats and oils in human nutrition. Rome, FAO, Food and Nutrition Paper, **1994**, *53*, 202-205.

- Fernández-García, E., Carvajal-Lerida, I., Pérez-Gálvez, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, **2009**, *29*, 751-760.

- Field, F.J., and Mathur, S.N.  $\beta$ -Sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *Journal of Lipid Research*, **1983**, *24*, 409-417.

- Field, F.J., Born, E., Mathur, S.N. Effect of micellar  $\beta$ -sitosterol on cholesterol metabolism in Caco-2 cells. *Journal of Lipid Research*, **1997**, *38*, 348-360.

- Fitzgerald, K.A., O'Neill, L.A.J., Gearing, A.J.H., Callard, R.E. The cytokine factsbook and webfacts (second ed.), Academic Press, **2001**.

- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **1957**, *226*, 497-509.

- García-Llatas, G., Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M.T., Lagarda, M.J., Farré, R., Lercker, G. Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 469-475.

- García-Llatas, G., and Rodríguez-Estrada, M.T. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2011**, 164, 607-624.

- Goncalves, A., Gleize, B., Bott, R., Nowicki, M., Amiot, M.J., Lairon, D., Borel, P., Reboul, E. Phytosterols can impair vitamin D intestinal absorption *in vitro* and in mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2011**, 55, S303-S311.

- Gonçalves, S., Vasco Maria, A., Silva-Herdade, A.S., Martins e Silva, J., Saldanha, C. Milk enriched with phytosterols reduces plasma cholesterol levels in healthy and hypercholesterolemic subjects. *Nutrition Research*, **2007**, 27, 200-205.

- González-Larena, M., Garcia-Llatas, G., Vidal, M.C., Sanchez-Siles, L.M., Barbera, R., Lagarda, M.J. Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 3624-3631.

- González-Larena, M., Cilla, A., García-Llatas, G., Barberá, R., Lagarda, M.J. Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 4725-4734.

- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., Blázquez-García, S. *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **2007**, 102, 641-648.

- Grandgirard, A., Sergiel, J., Nour, M., Demaison-Meloche, J., Giniès, C. Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats. *Lipids*, **1999**, 34, 563-570.

- Grandgirard, A. Biological effects of phytosterol oxidation products, future research areas and concluding remarks. In: Cholesterol and phytosterol oxidation

products: Analysis, occurrence, and biological effects. Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., Savage, G.P. (Eds.), AOCS Press, Champaign, IL, **2002**, 375-382.

- Grandgirard, A., Martine, L., Juaneda, J.P., Berdeaux, O. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxysterol derivatives. Application to a phytosterol-enriched food. *Journal of Chromatography A*, **2004a**, 1040, 239-250.

- Grandgirard, A., Martine, L., Demaison, L., Cordelet, C., Joffre, C., Berdeaux, O., Semon, E. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, **2004b**, 91, 101-106.

- Grandgirard, A., Demaison-Meloche, J., Cordelet, C., Demaison, L. Incorporation of oxyphytosterols in tissues of hamster. *Reproduction Nutrition Development*, **2004c**, 44, 599-608.

- Grandgirard, A., Martine, L., Juaneda, P., Cordelet, C. Sitostanetriol is not formed *in vivo* from sitosterol in the rat. *Reproduction Nutrition Development*, **2004d**, 44, 609-616.

- Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M., Boatella, J. Adsorption of oxysterols on different microtube materials during silanylation prior to gas chromatographic determination. *Journal of Chromatography A*, **1995**, 705, 289-304.

- Gutendorf, B., and Westendorf, J. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*, **2001**, 166, 79-89.

- Gylling, H., Puska, P., Vartiainen, E., Miettinen, T.A. Retinol, vitamin D, carotenes and  $\alpha$ -tocopherol in serum of a moderately hypercholesterolemic population consuming sitostanol ester margarine. *Atherosclerosis*, **1999**, 145, 279-285.

- Hamada, T., Goto, H., Yamahira, T., Sugawara, T., Imaizumi, K., Ikeda, I. Solubility in and affinity for the bile salt micelle of plant sterols are important determinants of their intestinal absorption in rats. *Lipids*, **2006**, 41, 551-555.

- Hansel, B., Nicolle, C., Lalanne, F., Tondou, F., Lassel, T., Donazzolo, Y., Ferrières, J., Krempf, M., Schlienger, J.L., Verges, B., Chapman, M.J., Bruckert, E. Effect of low-fat, fermented milk enriched with plant sterols on serum lipid profile and oxidative stress in moderate hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2007**, 86, 790-796.

- Heggen, E., Granlund, L., Pedersen, J.I., Holme, I., Ceglarek, U., Thiery, J., Kirkhus, B., Tonstad, S. Plant sterols from rapeseed and tall oils: Effects on lipids, fat-soluble vitamins and plant sterol concentrations. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **2010**, 20, 258-265.

- Heinemann, T., Axtmann, G., Von Bergman, K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *European Journal of Clinical Investigation*, **1993**, 23, 827-831.

- Hernández-Mijares, A., Bañuls, C., Rocha, M., Morillas, C., Martínez-Triguero, M.L., Víctor, V.M., Lacomba, R., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J. Effects of phytosterol ester-enriched low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake. *British Journal of Nutrition*, **2010**, 11, 1-8.

- Hirai, K., Shimazu, C., Takezoe, R., Ozeki, Y. Cholesterol, phytosterol and polyunsaturated fatty acid levels in 1982 and 1957 Japanese diets. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **1986**, 32, 363-372.

- Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., Joshi, A., Zhang, Y., Jaeger, S.A., Bulyk, M., Tschlis, P.N., Liu, S., Struhl, K. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell*, **2010**, 17, 348-361.



- Ho, S.S., and Pal, S. Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells. *Atherosclerosis*, **2005**, 182, 29-36.

- Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R.P., Trautwein, E.A. Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research*, **2008**, 47, 37-49.

- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., McClements, D.J. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **2011**, 125, 1-12.

- Husche, C., Weingartner, O., Pettersson, H., Vanmierlo, T., Bohm, M., Laufs, U., Lutjohann, D. Validation of an isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry method for analysis of 7-oxygenated campesterol and sitosterol in human serum. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2011**, 164, 425-431.

- Ifere, G.O., Barr, E., Equan, A., Gordon, K., Singh, U.P., Chaudhary, J., Igietseme, J.U., Ananaba, G.A. Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines. *Cancer Detection and Prevention*, **2009**, 32, 319-328.

- Ifere, G.O., Equan, A., Gordon, K., Nagappan, P., Igietseme, J.U., Ananaba, G.A. Cholesterol and phytosterols differentially regulate the expression of caveolin 1 and a downstream prostate cell growth-suppressor gene. *Cancer Epidemiology*, **2010**, 34, 461-471.

- Igel, M., Giesa, U., Lütjohann, D., Von Bergmann, K. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *Journal of Lipid Research*, **2003**, 44, 533-538.

- Ikeda, I., Tanaka, M., Sugano, M., Vahouny, G.V., Gallo, L.L. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *Journal of Lipids Research*, **1988**, 29, 1573-1582.

- Ikeda, I., Konno, R., Shimizu, T., Ide, T., Takahashi, N., Kawada, T., Nagao, K., Inoue, N., Yanagita, T., Hamada, T., Morinaga, Y., Tomoyori, H., Imaizumi, K., Suzuki, K. Campesterol, an oxidized derivative of campesterol, activates PPAR $\alpha$ , promotes energy consumption and reduces visceral fat depositions in rats. *Biochimica and Biophysica Acta*, **2006**, 1760, 800-807.

- Ito, N., Ohtsubo, T., Kusu, F., Hakamata, H. An ultra performance liquid chromatographic method for determining phytosterol uptake by Caco-2 cells. *Analytical Biochemistry*, **2012**, 421, 86-91.

- Janezic, S.A., and Rao, A.V. Dose-dependent effect of dietary phytosterols on epithelial cell proliferation of the murine colon. *Food and Chemical Toxicology*, **1992**, 30, 611-616.

- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, **1996**, 383, 728-731.

- Jayaprakasha, G.K., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G.A., Patil, B.S. Bioactive compounds from sour orange inhibit colon cancer cell proliferation and induce cell cycle arrest. *Food Chemistry*, **2010**, 58, 180-186.

- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Marchie, A., Faulkner, D.A., Wong, J.M.W., de Souza, R., Emam, A., Parker, T.L., Vidgen, E., Lapsley, K.G., Trautwein, E.A., Josse, R.G., Leiter, L.A., Connelly, P.W. Effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods versus lovastatin on serum lipids and C-reactive protein. *Journal of the American Medical Association*, **2003**, 290, 502-510.

- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Marchie, A., Faulkner, D.A., Josse, A.R., Wong, J.M.W., de Souza, R., Emam, A., Parker, T.L., Li, T.J., Josse, R.G., Leiter, L.A., Singer, W., Connelly, P.W. Direct comparison of dietary portfolio

versus statin on C-reactive protein. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 59, 851-860.

- Jesch, E.D., Seo, J.M., Carr, T.P., Lee, J.Y. Sitosterol reduces messenger RNA and protein expression levels of Niemann-Pick C1-like 1 in FHs 74 Int cells. *Nutrition Research*, **2009**, 29, 859-866.

- Jessup, W., Herman, A., Chapman, M.J. Phytosterols in cardiovascular disease: innocuous dietary components, or accelerators of atherosclerosis? *Future Lipidology*, **2008**, 3, 301-310.

- Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A.B., Saura-Calixto, F. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 3462-3471.

- Jones, P.J.H., Demonty, I., Chan, Y.M., Herzog, Y., Pelled, D. Fish-oil esters of plant sterols differ from vegetable-oil sterol esters in triglycerides lowering, carotenoid bioavailability and impact on plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations in hypercholesterolemic subjects. *Lipids in Health and Disease*, **2007**, 6, 28.

- Jones, P.J.H., and AbuMweis, S.S. Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **2009**, 12, 147-151.

- Johnsson, L., and Dutta, P.C. Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chemistry*, **2006**, 97, 606-613.

- Ju, Y.H., Clausem, L.M., Alfred, K.F., Almada, A.L., Helferich, W.  $\beta$ -Sitosterol,  $\beta$ -sitosterol glucoside and a mixture of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells *in vitro* and in ovariectomized athymic mice. *Journal of Nutrition*, **2004**, 134, 1145-1151.

- Jusakul, A., Yongvanit, P., Loilome, W., Namwat, N., Kuver, R. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids in Health and Disease*, **2011**, 10, 44.

- Kakis, G., Kuksis, A., Myher, J.J. Injected 7-oxo cholesterol and plant sterol derivatives and hepatic cholesterologenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1977**, 82, 297-299.

- Kaneko, E., Matsuda, M., Yamada, Y., Tachibana, Y., Shimomura, I., Makishima, M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 36091-36098.

- Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M.F.R.C.P., Miettinen, T., Paoletti, R. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings*, **2003**, 78, 965-978.

- Kemmo, S., Ollilainen, V., Lampi, A.M., Piironen, V. Liquid chromatography mass spectrometry for plant sterol oxide determination in complex mixtures. *European Food Research and Technology*, **2008**, 226, 1325-1334.

- Kenny, O., O'Callaghan, Y., O'Connell, N.M., Mc Carthy, F.O., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. Oxidized derivatives of dihydrobrassicasterol: cytotoxic and apoptotic potential in U937 and HepG2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 5952-5961.

- Kimura, Y., Yasukawa, K., Takido, M., Akihisa, T., Tamura, T. Inhibitory effect of some oxygenated stigmastane-type sterols on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **1995**, 18, 1617-1619.

- Kmiecik, D., Korczak, J., Rudzinska, M., Gramza Michałowska, A., Hes M. Stabilization of phytosterols in rapeseed oil by natural antioxidants during

heating. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2009**, 111, 1124-1132.

- Konno, R., Kaneko, Y., Suzuki, K., Matsui, Y., Effect of 5-campestenone (24-methylcholest-5-en-3-one) on Zucker diabetic fatty rats as a type 2 diabetes mellitus model. *Hormone and Metabolic Research*, **2005**, 37, 79-83.

- Korpela, J.T., and Adlercreutz, H. Fecal neutral sterols in omnivorous and vegetarian women. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **1985**, 20, 1180-1184.

- Korpela, R., Tuomilehto, J., Högström, P., Seppo, L., Salo-Väänänen, P., Toivo, J., Lamberg-Allardt, C., Kärkkäinen, M., Outila, T., Sundvall, J., Vilkkilä, S., Tikkanen, M.J. Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of low fat dairy products containing plant sterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2006**, 60, 633-642.

- Koschutnig, K., Heikkinen, S., Kemmo, S., Lampi, A.M., Piironen, K., Wagner H. Cytotoxic and apoptotic effects of single and mixed oxides of  $\beta$ -sitosterol on HepG2-cells. *Toxicology in Vitro*, **2009**, 23, 755-762.

- Koschutnig, K., Kemmo, S., Lampi, A.M., Piironen, V., Fritz-Ton, C., Wagner, K.H. Separation and isolation of  $\beta$ -sitosterol oxides and their non-mutagenic potential in the Salmonella microsome assay. *Food Chemistry*, **2010**, 118, 133-140.

- Kozłowska-Wojciechowska, M., Jastrzebska, M., Naruszewicz, M., Foltynska, A. Impact of margarine enriched with plant sterols on blood lipids, platelet function and fibrinogen level in young men. *Metabolism*, **2003**, 52, 1373-1378.

- Kritchevsky, D., Davidson, L.M., Mosbach, E.H., Cohen, B.I. Identification of acidic steroids in feces of monkeys fed  $\beta$ -sitosterol. *Lipids*, **1981**, 16, 77-78.

- Kritchevsky, D., and Chen, T.S. Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research*, **2005**, 25, 413-428.

- Kurano, M., Iso-O, N., Hara, M., Noiri, E., Koike, K., Kadowaki, T., Tsukamoto, K. Plant sterols increased IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion from macrophages but to a lesser extent than cholesterol. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, **2011**, 18, 373-383.

- Laakso, P. Analysis of sterols from various food matrices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2005**, 107, 402-410.

- Lake, R.J., and Scholes, P. Quality and consumption of oxidized lipids from deepfrying fats and oils in New Zealand. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1997**, 74, 1065-1068.

- Lagarda, M.J., García-Llatas, G., Farré, R. Analysis of phytosterols in foods. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41, 1486-1496.

- Lambelet, P., Grandgirard, E., Gregoire, S., Juaneda, P., Sebedio, J.L., Bertoli, C. Formation of modified fatty acids and oxyphytosterols during refining of low erucic acid rapeseed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 4284-4290.

- Lampi, A.M., Juntunen, L., Toivo, J., Piironen, V. Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *Journal of Chromatography B*, **2002**, 777, 83-92.

- Larsson, H., Böttiger, Y., Iuliano, L., Diczfalusy, U. *In vivo* interconversion of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **2007**, 43, 695-701.

- Lea, L.J., Hepburn, P.A., Wolfreys, A.M., Baldrick, P. Safety and evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food and Chemical Toxicology*, **2004**, 42, 771-783.

- Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., Nichols, P. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters, *Water Research*, **1996**, 30, 2893-2900.

- Leikin, A.I., and Brenner, R.R. Fatty acid desaturase activities are modulated by phytosterol incorporation in microsomes. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1989**, 1005, 187-191.

- Leonarduzzi, G., Gamba, P., Gargiulo, S., Biasi, F., Poli, G. Inflammation-related gene expression by lipid oxidation-derived products in the progression of atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, **2012**, 52, 19-34.

- Liang, Y.T., Wong, W.T., Guan, L., Tian, X.Y., YingMa, K., Huang, Y., Chen, Z.Y. Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, **2011**, 219, 124-133.

- Libby, P., and Ridker, P.M. Inflammation and atherosclerosis: role of C-Reactive protein in risk assessment. *American Journal of Medicine*, **2004**, 116, 9-16.

- Lin, D.S., Steiner, R.D., Merkens, L.S., Pappu, A.S., Connor, W.E. The effects of sterol structure upon sterol esterification. *Atherosclerosis*, **2010**, 208, 155-160.

- Livak, K.J., and Schmittge, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, **2001**, 25, 402-408.

- Llaverias, G., Escolà-Gil, J.C., Lerma, E., Julve, J., Pons, C., Cabré, A., Cofán, M., Ros, E., Sánchez-Quesada, J.L., Blanco-Vaca, F. Phytosterols inhibit the growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2013**, 24, 39-48.

- Lütjohann, D., Bjorkhem, I., Beil, U.F., Von Bergmann, K. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled

sterols: Effect of sitostanol treatment. *Journal of Lipid Research*, **1995**, 36, 1763-1773.

- Lyons, M.A., and Brown, A.J. Molecules in focus. 7-Ketocholesterol. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **1999**, 31, 369-375.

- Lyons, M.A., and Brown, A.J. Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol hydroxylase in HepG2 cells. *Lipids*, **2001**, 36, 701-711.

- Madsen, M.B., Jensen, A.M., Schmidt, E.B. The effect of a combination of plant sterol-enriched foods in mildly hypercholesterolemic subjects. *Clinical Nutrition*, **2007**, 26, 792-798.

- Maerker, G., Nungesser, E.H., Bunick, F.J. Reaction of cholesterol 5,6-epoxides with simulated gastric juice. *Lipids*, **1988**, 23, 761-765.

- Maguire, L., Konoplyannikov, M., Ford, A., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. Comparison of the cytotoxic effects of  $\beta$ -sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. *British Journal of Nutrition*, **2003**, 90, 767-775.

- Maguire, L.S., O'Sullivan, S.M., Galvin, K., O'Connor, T.P., O'Brien, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **2004**, 55, 171-178.

- Maki, K.C., Davidson, M.H., Umporowicz, D.M., Schaefer, E.J., Dicklin, M.R., Ingram, K.A., Chen, S., McNamara, J.R., Gebhart, B.W., Ribaya-Mercado, J.D., Perrone, G., Robins, S.J., Franke, W.C. Lipid responses to plant sterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2001**, 74, 33-43.

- Maki, K.C., Shinnick, F., Seeley, M.A., Veith, P.E., Quinn, L.C., Hallissey, P.J., Temer, A., Davidson, M.H. Food products containing free tall oil-based phytosterols and oat beta-glucan lower serum total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic adults. *Journal of Nutrition*, **2003**, 133, 808-813.



- Malaki Nik, A., Corredig, M., Wright, A.J. Release of lipophilic molecules during *in vitro* digestion of soy protein-stabilized emulsions. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2011**, 55, S278-S289.

- Mannarino, E., Pirro, M., Cortese, C., Lupattelli, G., Siepi, D., Mezzetti, A., Bertolini, S., Parillo, M., Fellin, R., Puija, A., Averna, M., Nicolle, C., Notarbartolo, A. Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: A multicenter Italian study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **2009**, 19, 84-90.

- Marangoni, F., and Poli, A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, **2010**, 61, 193-199.

- Matsuoka, K., Nakazawa, T., Nakamura, A., Honda, C., Endo, K., Tsukada, M. Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterols and stanol in bile salt micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2008**, 154, 87-93.

- Mascia, C., Maina, M., Chiarpotto, E., Leonarduzzi, G., Poli, G., Biasi, F. Proinflammatory effect of cholesterol and its oxidation products on Caco-2 human enterocyte-like cells: effective protection by epigallocatechin-3-gallate. *Free Radical Biology and Medicine*, **2010**, 49, 2049-2057.

- Matsuoka, K., Kajimoto, E., Horiuchi, M., Honda, C., Endo, K. Competitive solubilization of cholesterol and six species of sterol/stanol in bile salt micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2010**, 163, 397-402.

- McCann, S.E., Freudenheim, J.L., Marshall, J.R., Graham, S. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *Journal of Nutrition*, **2003**, 133, 1937-1942.

- McClements, D.J., and Li, Y. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food and Function*, **2010**, 1, 32-59.

- Mel'nikov, S.M., Seijen ten Hoorn, J.W.M., Eijkelenboom, A.P.A.M. Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by

dietary mixed micelles: an *in vitro* study. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2004**, 127, 121-141.

- Mendilaharsu, M., De Stefani, E., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J., Ronco, A. Phytosterols and risk of lung cancer: A case-control in Uruguay. *Lung Cancer*, **1998**, 21, 37-45.

- Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 9997-10002.

- Mensink, R.P., Ebbing, S., Lindhout, M., Plat, J., van Heugten, M.M. Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis*, **2002**, 160, 205-213.

- Meyer, W., Jungnickel, H., Jandke, M., Dettner, K., Spiteller, G. On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum* tested on meal-worms *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry*, **1998**, 47, 789-97.

- Mezine, I., Zhang, H., Macku, C., Lijana, R. Analysis of plant sterol and stanol esters in cholesterol-lowering spreads and beverages using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5639-5646.

- Micallef, M.A., and Garg, M.L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis*, **2009**, 204, 476-482.

- Miettinen, T.A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H., Vartiainen, E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *The New England Journal of Medicine*, **1995**, 333, 1308-1312.

- Miettinen, T.A., Vuoristo, M., Nissinen, M., Järvinen, H.J., Gylling, H. Serum, biliary and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2000**, 71, 1095-1102.
- Miller, D.D., Schriker, B.R., Rasmussen, B.S., Van Campen, D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1981**, 34, 2248-2256.
- Minihane, A.M., Fox, T.E., Fairweather-Tait, S.J. A continuous flow *in vitro* method to predict bioavailability of Fe from foods. En: Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability, proceedings. Part 2. Schlemmer U. (Ed.), Ettlingen, **1993**, 175-179.
- Montserrat-de la Paz, S., Fernández-Arche, A., Ángel-Martín, M., García-Giménez, M.D. The sterols isolated from *Evening Primrose* oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Phytomedicine*, **2012**, 19, 1072-1076.
- Mora, M.P., Tourne-Peteilh, C., Charveron, M., Fabre, B., Milon, A., Muller, I. Optimisation of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity. *Chemistry and Physics of Lipids*, **1999**, 101, 255-265.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, **2002**, 41, 457-500.
- Muller, C., Wagner, J., Johannes, C., Lorenz, R.L., Lehmann, L. Oxidation products of the phytosterol stigmasterol interact with estrogen receptor-dependent processes in cultured human breast and endometrium cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **2007**, 375, 80.
- Mussner, M.J., Parhofer, K.G., von Bergmann, K., Schwandt, P., Broedl, U., Otto, C. Effects of phytosterol ester-enriched margarine on plasma

lipoproteins in mild to moderate hypercholesterolemia are related to basal cholesterol and fat intake. *Metabolism*, **2002**, 51, 189-194.

- Narasinga Rao, B.S., Prabhavathi, T. An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1978**, 31, 169-175.

- Nashed, B., Yeganeh, B., HayGlass, K.T., Moghadasian, M.H. Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *Journal of Nutrition*, **2005**, 135, 2438-2444.

- Nestel, P., Cehun, M., Pomeroy, S., Abbey, M., Weldon, G. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2001**, 55, 1084-1090.

- Newill, H., Loske, R., Wagner, J., Johannes, C., Lorenz, R.L., Lehmann, L. Oxidation products of stigmasterol interfere with the action of the female sex hormone 17 $\beta$ -estradiol in cultured human breast and endometrium cell lines. *Molecular Nutrition of Food Research*, **2007**, 51, 888-898.

- Noakes, M., Clifton, P.M., Doornbos, A.M.E., Trautwein, E.A. Plant sterol ester-enriched milk and yoghurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, **2005**, 44, 214-222.

- Normén, L., Brants, H.A.M., Voorrips, L.E., Andersson, H.A., van den Brandt, P. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2001**, 74, 141-148.

- Normén, L., Bryngelsson, S., Johnsson, M., Eyheden, Ellega, L., Brantsm H., Andersson, H., Dutta, P. The phytosterol content of some cereal foods

commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2002**, 15, 693-704.

- Nourooz-Zadeh, J., and Appelquist, L.A. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: soybean oil and wheat flour. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1992**, 69, 288-293.

- Ntanios, F.Y., and Jones, P.J.H. Effects of variable dietary sitostanol concentrations on plasma lipid profile and phytosterol metabolism in hamsters. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1998**, 1390, 237-244.

- O'Callaghan, Y., Foley, D.A., O'Connell, N.M., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. Cytotoxic and apoptotic effects of the oxidized derivatives of stigmasterol in the U937 human monocytic cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 10793-10798.

- O'Callaghan, Y., Kenny, O., O'Connell, N.M., Maguire, A., McCarthy, F., O'Brien, N.M. Synthesis and assessment of the relative toxicity of the oxidised derivatives of campesterol and dihydrobrassicasterol in U937 and HepG2 cells. *Biochimie*, **2012**, *In press*.

- Osada, K., Sasaki, E., Sugano, M. Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats. *Lipids*, **1994**, 29, 555-559.

- Ostlund, R.E., McGill, J.B., Zeng, C., Covey, D.F., Stearns, J., Stenson, W.F., Spilburg, C.A. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy  $\Delta^5$ -phytosterols and phytosterols in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **2002**, 282, E911-E916.

- Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. Oxysterols: a world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, 48, 3289-3303.

- Othman, R.A., and Moghadasian, M.H. Beyond cholesterol-lowering effects of plant sterols: clinical and experimental evidence of anti-inflammatory properties. *Nutrition Reviews*, **2011**, 69, 371-382.

- Pakrashi, A., and Basak, B. Abortifacient effect of steroids from ananas comosus and their analogues on mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, **1976**, 46, 461-462.

- Palmgrén, J.J., Töyräs, A., Mauriala, T., Mönkkönen, J., Auriola, S. Quantitative determination of cholesterol, sitosterol, and sitostanol in cultured Caco-2 cells by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2005**, 821, 144-152.

- Palou, A., Picó, C., Bonet, M.L., Oliver, P., Serra, F., Rodríguez, A.M., Ribot, J. El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación. Unilever Food S.A., Barcelona, **2005**.

- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., Simpkins, A.H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2002**, 15, 123-142.

- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 9436-9445.

- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A.M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000a**, 80, 939-966.

- Piironen, V., Toivo, J., Lampi, A.M. Natural sources of dietary plant sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2000b**, 13, 619-624.

- Piironen, V., Toivo, J., Lampi, A.M. Plant sterols in cereals and cereal products. *Cereal Chemistry*, **2002**, 79, 148-154.

- Piironen, V., Toivo, J., Puupponen-Pimia, R., Lampi, A.M. Plant sterols in vegetable fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003**, 83, 330-337.

- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum,

A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, **1983**, 47, 323-330.

- Plana, N., Nicolle, C., Ferre, R., Camps, J., Cos, R., Villoria, J., Masana, L. Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, **2008**, 47, 32-39.

- Plat, J., and Mensink, R.P. Effects of diets enriched with two different plant stanol ester mixtures on plasma ubiquinol-10 and fat-soluble antioxidant concentrations. *Metabolism*, **2001**, 50, 520-529.

- Plat, J., Brzezinka, H., Lütjohann, D., Mensink, R.P., von Bergmann, K. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, **2001**, 42, 2030-2038.

- Plat, J., and Mensink, R.P. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *American Journal of Cardiology*, **2005**, 96, 15D-22D.

- Plat, J., Nichols, J.A., Mensink, R.P. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *Journal of Lipid Research*, **2005**, 46, 2468-2476.

- Plat, J., Brufau, G., Dallinga-Thie, G.M., Desselaar, M., Mensink, R.P. A plant stanol yogurt drink alone or combined with a low-dose statin lowers serum triacylglycerol and non-HDL cholesterol in metabolic syndrome patients. *Journal of Nutrition Nutrition and Disease*, **2009**, 139, 1143-1149.

- Polagruto, J.A., Wang-Polagruto, J.F., Braun, M.M., Lee, L., Kwik-Uribe, C. Cocoa flavanol-enriched snack bars containing phytosterols effectively lower total and low-density lipoprotein cholesterol levels. *Journal of the American Dietetic Association*, **2006**, 106, 1804-1813.

- Poli, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Leonarduzzi, G. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Molecular Aspects of Medicine*, **2009**, 30, 180-189.

- Pouteau, E.B., Monnard, I.E., Piguet-Welsch, C., Groux, M.J.A., Sagalowicz, L., Berger, A. Non-esterified plant sterols solubilized in low fat milks inhibit cholesterol absorption. A stable isotope double-blind crossover study. *European Journal of Nutrition*, **2003**, 42, 154-164.

- Quílez, J., García-Lorda, P., Salas-Salvado, J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: Present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, **2003a**, 22, 343-351.

- Quílez, J., Rafecas, M., Brufau, G., García-Lorda, P., Megías, I., Bulló, M., Ruiz, J.A., Salas-Salvadó, J. Bakery products enriched with phytosterols esters,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene decrease plasma LDL-cholesterol and maintain plasma  $\beta$ -carotene concentrations in normocholesterolemic men and women. *Journal of Nutrition*, **2003b**, 133, 3103-3109.

- Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P., Sarwal, A.N., Takahashi, M. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Research*, **1980**, 40, 403-405.

- Ratnayake, W.M.N., L'Abbé, M.R., Mueller, R., Hayward, S., Plouffe, L., Hollywood, R., Trick, K. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 1166-1178.

- Reglamento nº 1997/258/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de **1997** sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L043, 14.2.1997.

- Reglamento nº 2004/608/CE de la Comisión de 31 de marzo de **2004** relativo al etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitoesteroles,



ésteres de fitoesterol, fitoestanoles o ésteres de fitoestanol añadidos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L97/44, 1.4.2004.

- Reglamento 2009/983/CE de la Comisión 21 de octubre de **2009** sobre la autorización o la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L277/3, 22.10.2009.

- Reglamento 2012/432/CE de la Comisión de 16 de mayo de **2012** por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L136/1, 25.5.2012.

- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, R. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, **2008**, 3, 1125-1131.

- Rideout, T.C., Chan, Y., Harding, S.V., Jones P.J.H. Low and moderate-fat plant sterol fortified soymilk in modulation of plasma lipids and cholesterol kinetics in subjects with normal to high cholesterol concentrations: report on two randomized crossover studies. *Lipids in Health and Disease*, **2009**, 8, 45-51.

- Ros, E. Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Revista Española de Cardiología*, **2006**, 6, 52G-62G.

- Roussi, S., Winter, A., Gosse, F., Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F. Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7 $\beta$ -hydroxysitosterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, **2005**, 12, 128-135.

- Roussi, S., Gossé, F., Aoudé-Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7 $\beta$ -hydroxysitosterol and 7 $\beta$ -

hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, **2007**, 12, 87-96.

- Rozner, S., and Garti, N. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces*, **2006**, 282-283, 435-456.

- Rudkowska, I. Plant sterols and stanols for healthy ageing. *Maturitas*, **2010**, 66, 158-162.

- Rudzinska, M., Przybylski, R., Wasowicz, E. Products formed during thermo-oxidative degradation of phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2009**, 86, 651-662.

- Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxicity and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *British Journal of Nutrition*, **2005**, 94, 443-451.

- Ryan, E., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Reviews International*, **2009**, 25, 157-174.

- Salen, G., Ahrens, E.H., Grundy, S.M. Metabolism of  $\beta$ -sitosterol in man. *Journal of Clinical Investigation*, **1970**, 49, 952-967.

- Salen, G., Shefer, S., Nguyen, L., Ness, G.C., Tint, G.S., Shore, V. Sitosterolemia. *Journal of Lipid Research*, **1992**, 33, 945-957.

- Salo, P., and Wester, I. Low-fat formulations of plant stanols and sterols. *American Journal of Cardiology*, **2005**, 96, 51D-54D.

- Sanders, D.J., Minter, H.J., Howes, D., Hepburn, P.A. The safety evaluation of phytosterol esters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, **2000**, 38, 485-491.

- Saraiva, D., Castilho, M.C., Martins, M.R., Noronha da Silveira, M.I., Ramos, F. Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, **2011**, 4, 28-34.
- Sato, H., Nishida, S., Tomoyori, H., Sato, M., Ikeda, I., Imaizumi, K. Oxysterol regulation of estrogen receptor  $\alpha$ -mediated gene expression in a transcriptional activation assay system using HeLa cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2004**, 68, 1790-1793.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, **2007**, 101, 492-501.
- Schiepers, O.J.G., de Groot, R.H.M., van Boxtel, M.P.J., Jolles, J., de Jong, A., Lütjohann, D., Plat, J., Mensink, R.P. Consuming functional foods enriched with plant sterol or stanol esters for 85 weeks does not affect neurocognitive functioning or mood in statin-treated hypercholesterolemic individuals. *Journal of Nutrition Nutritional Epidemiology*, **2009**, 139, 1368-1373.
- Schroeder, G., Rohmer, M., Beck, J.P., Anton, R. 7-Oxo-, 7 $\alpha$ -hydroxy and 7 $\beta$ -hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 2213-2215.
- Schroeffer, G.J. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews*, **2000**, 80, 361-554.
- Schothorst, R.C., and Jekel, A.A. Oral sterol intake in The Netherlands: evaluation of the results obtained by GC analysis of duplicate 24-h diet sample collected in 1994. *Food Chemistry*, **1999**, 64, 561-566.
- Schümann, K., Elsenhans, B., Gordon, D.T., Schlemmer, U. Bioavailability '93: different aspects of 'bioavailability' in perspective. *British Journal of Nutrition*, **1994**, 72, 950-952.
- Scoles, D.R., Xu, X., Wang, H., Tran, H., Taylor-Harding, B., Li, A., Karlan, B. Liver X receptor agonist inhibits proliferation of ovarian carcinoma

cells stimulated by oxidized low density lipoprotein. *Gynecologic Oncology*, **2010**, 116, 109-116.

- Seppo, L., Jauhiainen, T., Nevala, R., Poussa, T., Korpela, R. Plant stanol esters in low-fat milk products lower serum total and LDL cholesterol. *European Journal of Nutrition*, **2007**, 46, 111-117.

- Sialvera, T.E., Pounis, G.D., Koutelidakis, A.E., Richter, D.J., Yfanti, G., Kapsokefalou, M., Goumas, G., Chiotinis, N., Diamantopoulos, E., Zampelas, A., Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **2012**, 22, 843-848.

- Sioen, I., Matthys, C., Huybrechts, I., Van Camp, J., De Henauw, S. Consumption of plant sterols in Belgium: estimated intakes and sources of naturally occurring plant sterols and  $\beta$ -carotene. *British Journal of Nutrition*, **2011**, 105, 960-966.

- Smith, L.L. The oxidation of cholesterol. In: Biological effects of cholesterol oxides. Peng, S.K., Morin, R.J. (Eds.), CRC Press, London, **1992**, 7-31.

- Sottero, B., Gamba, P., Gargiulo, S., Leonarduzzi, G., Poli, G. Cholesterol oxidation products and disease: An emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, **2009**, 16, 685-705.

- Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A.M., Piironen, V. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 6485-6491.

- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Piironen, V. Esterification affects phytosterol oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2005**, 107, 107-118.

- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M. Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, **2006**, 222, 266-273.
- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Piironen, V. Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chemistry*, **2007**, 101, 286-297.
- Steinberg, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine*, **2002**, 8, 1211-1217.
- Stryer, L. Bioquímica. Third ed. Barcelona, Spain, **1988**.
- Subbiah, M.T., and Kuksis, A. Oxidation of 4-14C-sitosterol by mitochondria of rat liver and testes. *Federation proceedings*, **1969**, 28, 515.
- Subbiah, M.T.R., and Kuksis, A. Differences in metabolism of cholesterol and sitosterol following intravenous injection in rats. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1973**, 306, 95-105.
- Sudhop, T., and von Bergmann, K. Sitosterolemia – a rare disease. Are elevated plant sterols an additional risk factor? *Zeitschrift für Kardiologie*, **2004**, 93, 921-928.
- Sumner, C.E., Bernicki, S.D., Dolfi, M.D. Process of the production of sterol and tocopherol concentrates. U.S. Patent 5424457A, **1995**.
- Suzuki, K., Shimizu, T., Nakata, T. The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivatives suppress body weight gain, body fat accumulation and serum lipid concentration in mice. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **1998**, 8, 2133-2138.
- Suzuki, K., Tanaka, M., Konno, R., Kaneko, Y. Effects of 5-campestenone (24-methylcholest-5-en-3-one) on the type 2 diabetes mellitus model animal C57BL/KsJ-db/db mice. *Hormone and Metabolic Research*, **2002**, 34, 121-126.
- Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1963**, 85, 2497-2507.

- Tabee, E., Jägerstad, M., Dutta, P.C. Lipids and phytosterol oxidation products in commercial potato crisps commonly consumed in Sweden. *European Food Research and Technology*, **2008**, 227, 745-755.

- Temel, R.E., Gebre, A.K., Parks, J.S., Rudel., L.L. Compared with Acyl-CoA: Cholesterol *O*-Acyltransferase (ACAT) and Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 47594-47601.

- Thomsen, A.B., Hansen, H.B., Christiansen, H.G., Berger, A. Effect of free plant sterols in low-fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2004**, 58, 860-870.

- Tomoyori, H., Kawata, Y., Higuchi, T., Ichi, I., Sato, H., Sato, M., Ikeda, I., Imaizumi, K. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice. *Journal of Nutrition*, **2004**, 134, 1690-1696.

- Trautwein, E.A., Duchateau, G.S.M.J.E., Lin, Y., Mel'nikov, S., Molhuizen, H.O.F., Ntanos, F.Y. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2003**, 105, 171-185.

- Trautwein, E.A., and Demonty, I. Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits. *Oleagineux Corps Gras Lipides*, **2007**, 14, 259-266.

- Traversari, C., and Russo, V. Control of the immune system by oxysterols and cancer development. *Current Opinion in Pharmacology*, **2012**, 12, 729-735.

- Turchetto, E., Lercker, G., Bortolomeazzi, R. Oxysterol determination in selected coffees. *Toxicology and Industrial Health*, **1993**, 9, 519-527.

- Turnbull, D., Frankos, V.H., Leeman, W.R., Jonker, D. Short-term tests of estrogenic potential of plant stanols and plant stanol esters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **1999**, 29, 211-215.

- Ubhayasekera, S.J.K.A., and Dutta, P.C. Sterols and oxidized sterols in feed ingredients obtained from chemical and physical refining processes of fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2009**, 86, 595-604.

- Valerio, M., and Awad, A.B.  $\beta$ -sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *International Immunopharmacology*, **2011**, 11, 1012-1017.

- Valsta, L.M., Lemström, A., Ovaskainen, M.L., Lampi, A.M., Toivo, J., Korhanen, T., Piironen, V. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *British Journal of Nutrition*, **2004**, 92, 671-678.

- Van Campen, D.R., and Glahn, R.P. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crop Research*, **1999**, 60, 93-113.

- Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-Schuil, T.G., Katan, B. Quantification of oxysterols in dutch foods egg products and mixed diets. *Lipids*, **1988**, 23, 1079-1085.

- Van den Heuvel, M.R., Leusch, F.D.L., Taylor, S., Shannon, N., McKague, A.B. Assessment of the reproductive-endocrine disrupting potential of chlorine dioxide oxidation products of plant sterols. *Environmental Science and Technology*, **2006**, 40, 2594-2600.

- Van De Walle, J., Romier, B., Larondelle, Y., Schneider, Y.J. Influence of deoxynivalenol on NF- $\kappa$ B activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicology Letters*, **2008**, 177, 205-214.

- Vanmierlo, T., Husche, C., Schött, H.F., Pettersson, H., Lütjohann, D. Plant sterol oxidation products e Analogs to cholesterol oxidation products from plant origin?. *Biochimie*, **2012**, 53, 726-735.

- Vejux, A., and Lizard, G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*, **2009**, 30, 153-170.

- Vejux, A., Montagne, T., Martine, L., Zarrouk, A., Riedinger, J-M., Lizard, G. Absence of oxysterol-like side effects in human monocytic cells treated with phytosterol and oxyphytosterols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 4060-4066.

- Versantvoort, C.H.M., Oomen, A.G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing bioaccessibility of micotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, **2005**, 43, 31-40.

- Von Holtz, R.L., Fink, C.S., Awad, A.B.  $\beta$ -sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells, *Nutrition and Cancer*, **1998**, 32, 8-12.

- Weidner, C., Krempf, M., Bard, J.M., Cazaubiel, M., Bell, D. Cholesterol lowering effect of a soy drink enriched with plant sterols in a French population with moderate hypercholesterolemia. *Lipids in Health and Disease*, **2008**, 7, 35.

- Weststrate, J.A., Ayesh, R., Bauer-Plank, C., Drewitt, P.N. Safety evaluation of phytosterol esters: Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37, 1063-1071.



- Wienk, K.J.H., Marx, J.J.M., Beynen, A.C. The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, **1999**, 38, 51-75.
- Wolff, R.A., Dobrowsky, R.T., Bielawski, A., Obeid, L.M. Hannun, Y.A. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269, 19607-19609.
- Wolfs, M., de Jong, N., Ocke, M.C., Verhagen, H., Verschuren, W.M.M. Effectiveness of customary use of phytosterol/-stanol enriched margarines on blood cholesterol lowering. *Food and Chemical Toxicology*, **2006**, 44, 1682-1688.
- Woyengo, T.A., Ramprasath, V.R., Jones, P.J.H. Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2009**, 63, 813-820.
- Xu, G., Guan, L., Sun, J., Chen, Z.Y. Oxidation of cholesterol and  $\beta$ -sitosterol and prevention by natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 9284-9292.
- Yanishlieva, N., Schiller, H., Marinova, E. Autoxidation of sitosterol II: Main products formed at ambient and high temperature treatment with oxygen. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **1980**, LVII, 572-576.
- Yoshida, M., Vanstonem C.A., Parsons, W.D., Zawistowski, J., Jones, P.J.H. Effect of plant sterols and glucomannan on lipids in individuals with and without type II diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2006**, 60, 529-537.
- Yu, L., Hammer, R.E., Li-Hawkins, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2002**, 99, 16237-16242.
- Zhang, X., Julien-David, D., Miesch, M., Geoffroy, P., Raul, F., Roussi, S., Aoudé-Werner, D., Marchioni, E. Identification and quantitative analysis of

$\beta$ -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids*, **2005**, 70, 896-906.

- Zhang, X., Julien-David, D., Miesch, M., Raul, F., Geoffroy, P., Aoudé-Werner, D., Ennahar, S.D., Marchioni, E. Quantitative analysis of  $\beta$ -sitosterol oxides induced in vegetable oils by natural sunlight, artificially generated light and irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 5410-5415.

- Zhao, Y., Chang, S.C., Gang Qu., Li, T., Cui, H.  $\beta$ -Sitosterol inhibits cell growth and induces apoptosis in SGC-7901 human stomach cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 5211-5218.

- Zunin, P., Calcagno, C., Evangelisti, F. Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *Journal of Dairy Research*, **1998**, 65, 591-59.

**ANEXOS**

***ANNEXES***



**ANEXO I.** Nombres comunes y sistemáticos de esteroides y sus óxidos.

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre sistemático</b>
<b>Brasicasterol</b>	<b>(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3<math>\beta</math>-ol</b>
7 $\alpha$ -Hidroxibrasicasterol	(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol
7 $\beta$ -Hidroxibrasicasterol	(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol
5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxibrasicasterol	(24S)-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxi-24-metilcolest-22-en-3 $\beta$ -ol
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxibrasicasterol	(24S)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxi-24-metilcolest-22-en-3 $\beta$ -ol
Brasicastanotriol	(24S)-Metilcolest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol
7-Cetobasicasterol	(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol-7-ona
<b>Estigmasterol</b>	<b>(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3<math>\beta</math>-ol</b>
7 $\alpha$ -Hidxiestigmasterol	(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol
7 $\beta$ -Hidxiestigmasterol	(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol
5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxiestigmasterol	(24S)-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxi-24-etilcolest-22-en-3 $\beta$ -ol
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxiestigmasterol	(24S)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxi-24-etilcolest-22-en-3 $\beta$ -ol
Estigmastanotriol	(24S)-Etilcolest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol
7-Cetoestigmasterol	(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol-7-ona
<b>Campesterol</b>	<b>(24R)-Metilcolest-5-en-3<math>\beta</math>-ol</b>
7 $\alpha$ -Hidroxicampesterol	(24R)-Metilcolest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol
7 $\beta$ -Hidroxicampesterol	(24R)-Metilcolest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol
5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxicampesterol	(24R)-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxi-24-metilcolestan-3 $\beta$ -ol
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxicampesterol	(24R)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxi-24-metilcolestan-3 $\beta$ -ol
Campestanotriol	(24R)-Metilcolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol
7-Cetocampesterol	(24R)-Metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol-7-ona
<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>(24R)-Etilcolest-5-en-3<math>\beta</math>-ol</b>
7 $\alpha$ -Hidroxisitosterol	(24R)-Etilcolest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol
7 $\beta$ -Hidroxisitosterol	(24R)-Etilcolest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol
5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxisitosterol	(24R)-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxi-24-etilcolestan-3 $\beta$ -ol
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxisitosterol	(24R)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxi-24-etilcolestan-3 $\beta$ -ol
Sitostanotriol	(24R)-Etilcolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol
7-Cetositosterol	(24R)-Etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol-7-ona
<b>Colesterol</b>	<b>Colest-5-en-3<math>\beta</math>-ol</b>
7 $\alpha$ -Hidroxicolesterol	Colest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol
7 $\beta$ -Hidroxicolesterol	Colest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol
5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxicolesterol	5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxicolestan-3 $\beta$ -ol
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxicolesterol	5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxicolestan-3 $\beta$ -ol
Colestanotriol	Colestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol
7-Cetocolesterol	Colest-5-en-3 $\beta$ -ol-7-ona



## ANEXO II. Metodología.

### A. Determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en esteroides vegetales.

*Extracción de la fracción lipídica:* Se aplica el método descrito por Folch et al. (1957) modificado por Boselli et al. (2001).

A un peso de muestra conteniendo 60 mg de EV se le añaden 40 mL de una disolución cloroformo: metanol (1:1, v/v), se homogeniza con Polytron® (PT 2000, Kinematica AG) durante 3 minutos y se mantiene en estufa ( $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , Heraeus Instruments) a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Después de atemperar la muestra, se añaden 20 mL de cloroformo y, tras homogenizar de nuevo con Polytron®, se filtra con embudo Büchner sobre papel de filtro Wathman n°1, lavando el recipiente dos veces con 10 mL de cloroformo. Se transvasa la muestra a una botella Pyrex®, se añaden 20 mL de cloruro potásico 1M y se agita vigorosamente durante 1 minuto. La muestra se mantiene toda la noche en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

*Separación de la fracción lipídica:* Se transfiere la muestra a un embudo de decantación y, tras la separación de las fases de diferente naturaleza, se recoge la fase orgánica. Se le añade cantidad suficiente de sulfato sódico para eliminar el agua y se mantiene en refrigeración durante 2h. La muestra se filtra (Wathman n°1) sobre un matraz de fondo redondo y se seca, inicialmente con evaporador rotatorio (R-200 con baño termostático B-490, BÜCHI) y finalmente bajo corriente de nitrógeno hasta peso constante. Se mantiene 1 h en el desecador (en la oscuridad) y,

por último, se pesa en balanza analítica ( $\pm 0,0001\text{g}$ ) obteniendo así la cantidad de grasa extraída.

El extracto se disuelve con 10 mL de hexano:isopropanol (Hx:Ip) (4:1, v/v), se divide en 2 alícuotas y se guarda en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

### ***A.1. Determinación de esteroides vegetales***

*Hidrólisis alcalina (en caliente) y extracción de la fracción insaponificable* (Piironen et al., 2000b). Una fracción de grasa extraída se atempera en un baño a  $30^{\circ}\text{C}$  (Digiterm 100, Selecta), se adicionan 4 mg de epicoprostanol como patrón interno (PI) y se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno. Se adicionan 3 mL de potasa metanólica 1N (con 0,05% BHT), se dispersa la grasa mediante agitación ultrasónica (Selecta® Ultrasons) y se mantiene a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 1h, agitando a los 30 min.

Se transfiere la muestra a un embudo de decantación lavando el tubo que la contenía con 5 mL de agua milliQ (2 + 3 mL) y 10 mL de éter etílico (2 + 3 + 5 mL) agitando tras la adición. La fase acuosa se lava otras 2 veces con éter etílico (2 x 5 mL). Las fases etéreas se reúnen, se lavan 2 veces con 2 mL de hidróxido potásico (acuoso) 0,5 N y, finalmente 2-3 veces con 5 mL de cloruro sódico al 20% (p/v) hasta conseguir que el pH sea neutro. La fase orgánica se deseca con sulfato de sodio anhidro en exceso y, tras mantenerla en refrigeración (2 h), se filtra (Wathman n° 1) y se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno. El insaponificable se disuelve con 10 mL de Hx:Ip (4:1, v/v) y se mantiene en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), hasta su derivatización.



*Derivatización:* Se realiza siguiendo el modo operatorio descrito por Sweeley et al. (1963), para la obtención de trimetilsililéteres. Un mL del insaponificable se transfiere a un tubo de fondo cónico de 10 mL previamente tratado con el reactivo silanizante (piridina: HMDS: TMCS, 5:2:1, v/v/v). Tras evaporación del disolvente bajo corriente de nitrógeno, se añaden 300 µL de reactivo silanizante, se purga con nitrógeno y se calienta a 40°C en un bloque calefactor (Blockheater, Stuart Cientific) durante 25 min (agitando a los 15 min). Posteriormente, la muestra se atempera y se deseca bajo corriente de nitrógeno. Se disuelve en 1 mL de Hx y, tras agitación ultrasónica, se filtra con filtro Millex-FH (4 mm, 0,45 µm) (Millipore) sobre otro tubo tronco cónico de 10 mL, para eliminar los restos del reactivo silanizante. La muestra se evapora bajo corriente de nitrógeno y se disuelve con 250 µL de Hx, inyectándose 1µL en cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID) y en cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS).

*Identificación y cuantificación.* La identificación de los EV se realiza mediante comparación de su tiempo de retención con el de patrones en GC-FID así como contrastando los espectros obtenidos por GC-MS. Las condiciones cromatográficas en GC-FID son: un equipo Perkin-Elmer AutoSystem XL provisto de una columna capilar CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (5% fenil-95% dimetillpolisiloxano, Varian®),

El hidrógeno (15 psi) es el gas portador y la relación de split de 1:20. La temperatura inicial del horno (280°C) se mantiene durante 20 min, elevándola a 290°C con una rampa de 0,7°C/min y manteniéndola durante

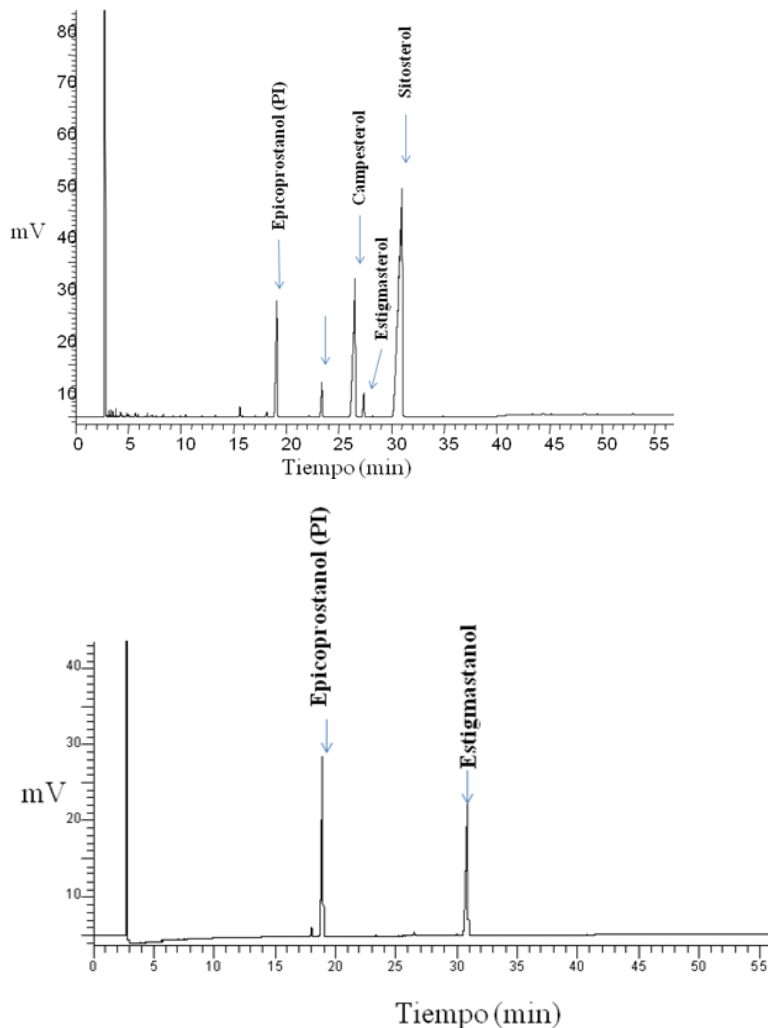
20 min. Finalmente la temperatura asciende a 320°C (30°C/min) y se mantiene durante 45 min. Para la GC-MS, se utiliza un cromatógrafo Thermo Scientific Trace GC-Ultra, provisto inicialmente con una columna TR-5ms SGC (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). La temperatura del horno, inicialmente a 250°C, asciende (0,8°C/min) hasta 280°C y, posteriormente hasta 310°C (5°C/min) durante 5 min. El inyector (AI/AS 3000) consta de un sistema de vaporización con temperatura programada (PTV) inicialmente a 260°C. La fuente, a 250°C, emite una corriente de 70 eV, siendo la temperatura de la *transfer line* de 310°C. El flujo del gas portador (hidrógeno) es de 1 mL/min, siendo la relación de split de 1:10. El detector, en método *full scan* (50-650 m/z) está provisto de una trampa iónica (ITQ 900) (**Método GC-MSA**). Las condiciones utilizadas en GC-MS son similares a las anteriormente citadas para GC-FID excepto la temperatura del horno, inicialmente a 70°C durante 1 min, asciende a 280°C rápidamente (30°C/min), manteniéndose durante 12 minutos. Posteriormente la temperatura incrementa a 290°C (0,7 °C/min) y se mantiene constante durante 20 min. Finalmente, la temperatura asciende a 300°C (5°C/min), manteniéndose durante 45 min (**Método GC-MSB**).

Los intervalos de concentración de las curvas de calibrado utilizadas para la cuantificación de los fitoesteroles detectados por GC-FID son: brasicasterol (9,9 – 59,2 µg), campesterol (98,6 – 550,2 µg), estigmasterol (9,5 – 99,8 µg) y β-sitosterol (700,6 – 2398,8 µg). El perfil cromatográfico y las curvas de calibrado obtenidas para los diferentes fitoesteroles y se muestran en la **figura n° 18** y el **cuadro n° 17**, respectivamente. La cuantificación de los fitostanoles (campestanol y sitostanol) se realiza utilizando el factor de respuesta (FR) calculado a partir del único

fitostanol comercializado (estigmastanol) frente al epicoprostanol (PI). Se inyecta en GC-FID un estándar con el mismo contenido de PI y de estigmastanol derivatizado como se ha detallado anteriormente. A partir de la relación de áreas entre los dos compuestos ( $A_{PI}/A_{Estigmastanol}$ ) se obtiene el FR ( $FR = 0,879 \pm 0,096$ ) (ver figura Xb).

En la **figura n° 19** se muestra el esquema de determinación de EV.

Figura n° 18. Identificación de los esteroides vegetales por GC-FID.



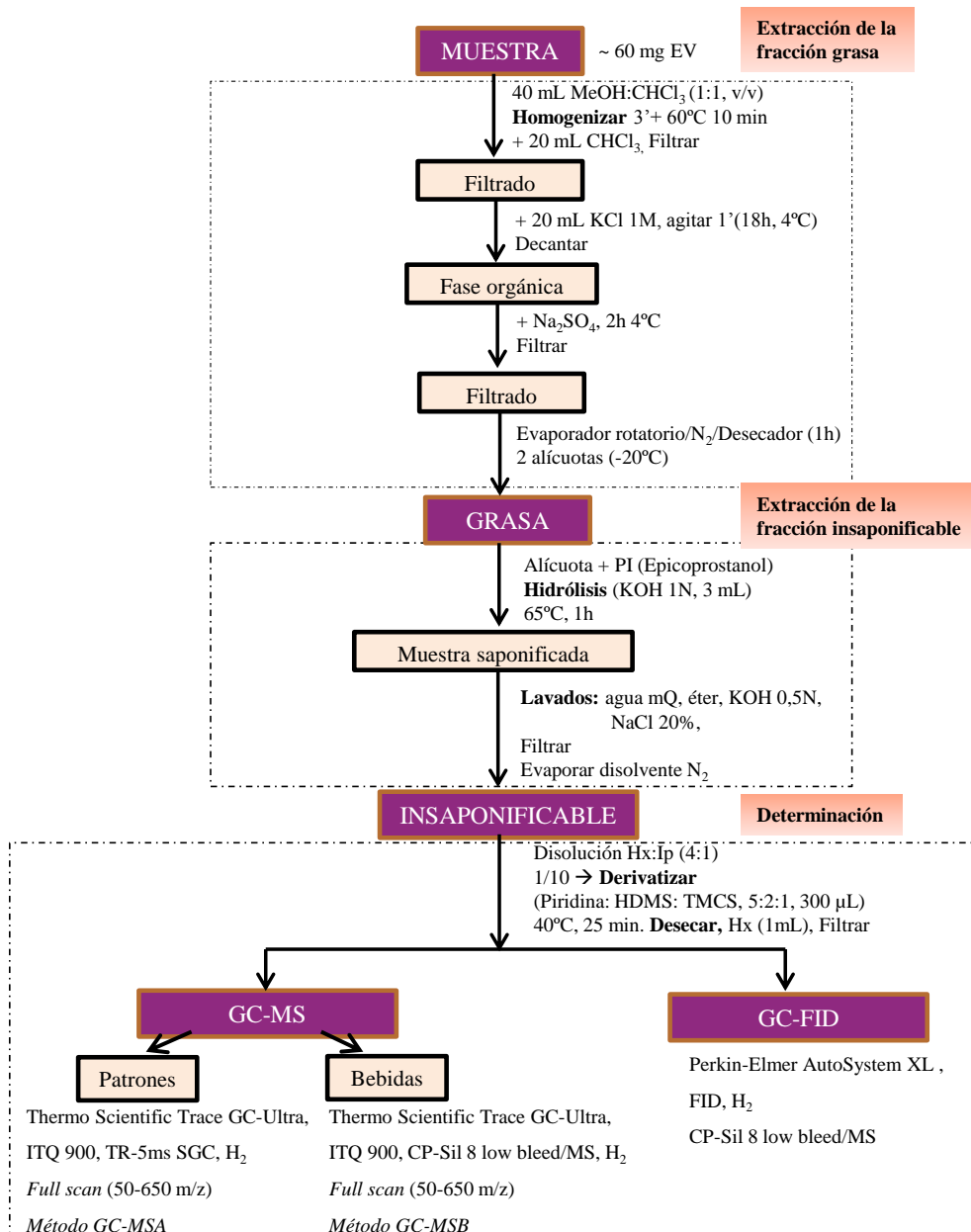
Cuadro n° 17. Linearidad. Curvas de calibrado de los fitoesteroles y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ).

<b>Fitoesteroles</b>	<b>Curvas de calibrado</b>	<b><math>R^2</math></b>
Brasicasterol	$y = 1,6707x + 0,0075$	0,9956
Campesterol	$y = 1,4106x + 0,0340$	0,9890
Estigmasterol	$y = 0,7393x + 0,0007$	0,9991
$\beta$ -Sitosterol	$y = 1,2264x + 0,3480$	0,9910

---

x:  $\mu\text{g}$  patrón/ $\mu\text{g}$  PI e y área EV/área PI.

Figura nº 19. Esquema de determinación de esteroides vegetales.



### ***A.2 Determinación de óxidos de esteroides vegetales***

El procedimiento es similar al descrito anteriormente para EV salvo la hidrólisis alcalina (que se realiza a temperatura ambiente) y la introducción de una etapa de purificación de la fracción insaponificable mediante extracción en fase sólida (SPE).

*Saponificación a temperatura ambiente y extracción de la fracción insaponificable* (Conchillo et al., 2005). Se adicionan 10 µg de 19-hidroxicolesterol (PI) a una alícuota de grasa y se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno. Se adicionan 10 mL de potasa metanólica 1N (con 0,05% BHT), dispersando totalmente la grasa mediante agitación ultrasónica. Las muestras se mantienen en agitación orbital continua (KS 260 basic, IKA®) (150 rev/min) en posición horizontal y en la oscuridad durante 18-20 h. La fracción insaponificable se extrae siguiendo el mismo procedimiento descrito para EV (apartado A.1) variando los volúmenes de extracción y de lavado: 10 mL de agua milliQ (3 + 7 mL), 20 mL de éter etílico (3 + 7 + 10 mL), éter etílico (2 x 10 mL). Las fases etéreas se reúnen, se lavan 2 veces con 5 mL de hidróxido potásico (acuoso) 0,5 N y, finalmente 2-3 veces con 8 mL de cloruro sódico al 20% (p/v) hasta conseguir que el pH sea neutro. La fase orgánica se deseca con sulfato de sodio anhidro en exceso y, tras mantenerla en refrigeración (2 h), se filtra (Wathman nº 1) y se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno. El insaponificable se disuelve con 10 mL de Hx:Ip (4:1, v/v) se divide la muestra en 2 alícuotas y se mantiene en congelación (-20°C), hasta su derivatización.

*Purificación de POPs mediante SPE.* Se sigue el procedimiento descrito por Guadiola et al. (1995). Una alícuota del insaponificable se evapora bajo corriente de nitrógeno. Se disuelve en la mínima cantidad de Hx:éter (95:5, v/v) (3 x 100 µL) (lavando el tubo) y se purifica con cartuchos de sílice de 500 mg (Supelco Sperclean™ LC-Si) previamente activados con 5 mL de Hx. Las interferencias se eliminan con 5 mL de Hx, 10 mL de Hx:éter (95:5, v/v), 30 mL de Hx:éter (90:10, v/v) y 10 mL de Hx:éter (80:20, v/v). Los POPs se eluyen con 10 mL de acetona, guardándose en congelación (-20°C) hasta su derivatización, la cual se realiza siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el apartado A.1 y disolviendo el residuo final en 40 µL de Hx e inyectando 1 µL en GC-MS para su identificación y en GC-FID para su cuantificación.

#### *Identificación y cuantificación.*

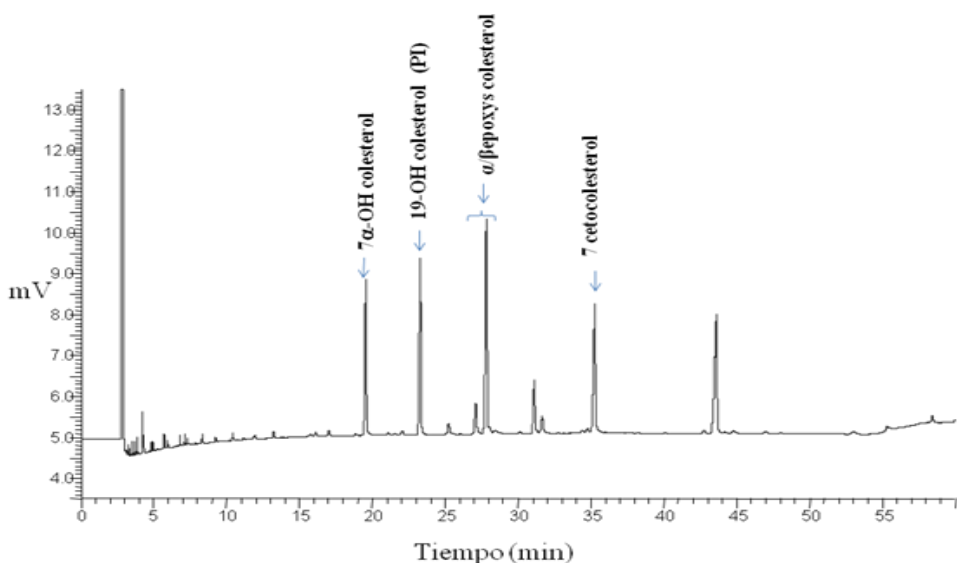
Diez mL de una disolución de cada uno de los patrones de EV ( $\beta$ -sitosterol (95%), campesterol (98,6%) y estigmasterol (95%)) de concentración 1mg/mL en Hx:Ip (3:2, v/v) se introducen en placas Petri, se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno y se mantiene en la estufa a 150°C durante 2h (Conchillo et al., 2005). El residuo se disuelve con 10 mL de Hx:Ip (3:2, v/v), utilizando 1 mL para su purificación (Guardiola et al., 1995) y posterior derivatización (Sweleey et al., 1963) como se ha descrito en este apartado (*purificación de POPs mediante SPE*). Para su identificación, se inyecta 1 µL en GC-MS. Las condiciones cromatográficas utilizadas para la identificación de los POPs en los patrones termooxidados por GC-MS son las descritas para los EV (**método GC-MSA**, apartado A.1). Sin embargo, las bebidas a base de

zumo de frutas y/o leche enriquecidas con EV han sido analizadas mediante el **método GC-MSB** (apartado A.1)

Para la cuantificación se inyecta 1  $\mu\text{L}$  en GC-FID, se utilizan las condiciones descritas en el apartado A.1, excepto la temperatura del horno que, inicialmente a 280°C (20 min), incrementa su  $T^a$  hasta 290°C (0,7°C/min) durante 20 min, aumentando rápidamente (30°C/min) hasta 320°C y manteniéndola durante 45 min.

La cuantificación se lleva a cabo mediante los FR calculados a partir de disoluciones patrón de COPs y 7-cetoestigmasterol de 10  $\mu\text{g}$ , conteniendo una cantidad equivalente de 19-hidroxicolesterol (PI), derivatizados siguiendo el mismo modo operatorio detallado en este apartado (*purificación de POPs mediante SPE*). Los FR de los COPs, y del 7-cetoestigmasterol se muestran y detallan en la **figura n° 20** y en el **cuadro n° 18**. De modo aclaratorio, en la **figura n° 21**, se muestra el esquema de determinación de POPs en las muestras analizadas.

Figura n° 20. Factor de respuesta de los óxidos de colesterol.



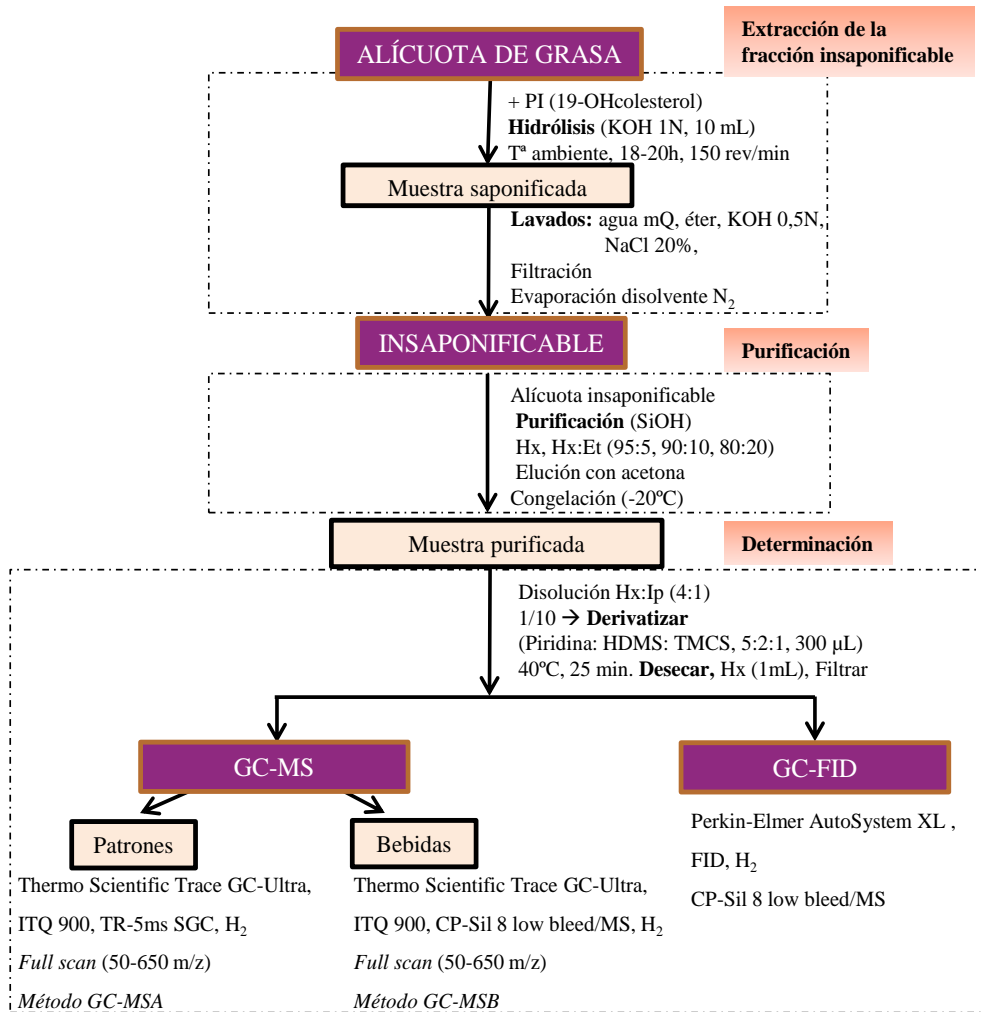


Cuadro n° 18. Factores de respuesta calculados a partir de 3 réplicas independientes.

<b>Patrón comercial</b>	<b>FR ± DE</b>
7 $\alpha$ -hidroxicolesterol	1,140 ± 0,094
$\beta$ -epoxicolesterol	0,722 ± 0,021
7-cetocolesterol	1,154 ± 0,046
7-cetoestigmasterol	1,121 ± 0,099

FR: factor de respuesta, DE: desviación estándar

Figura nº 21. Esquema de determinación de óxidos de esteroides.



## **B. Evaluación de la bioaccesibilidad de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en esteroides vegetales.**

### ***B.1 Digestión gastrointestinal***

Se simula una digestión gastrointestinal con el fin de estimar la el grado de solubilidad de estos compuestos en la fracción bioaccesible (FB), es decir, la que teóricamente podría ser captada por la mucosa intestinal. Se aplica el método de Granado et al. (2007) que incluye tres etapas: la salivar, en la que se utiliza un jugo constituido de elementos inorgánicos, orgánicos y enzimas que simula la composición de la saliva, la gástrica en la que se utiliza jugo gástrico y la duodenal en la que se utiliza el duodenal y la bilis, respectivamente.

Los diferentes jugos utilizados se preparan según se indica en el **cuadro nº 19**.

Cuadro n° 19. Composición de los diferentes jugos empleados en la digestión gastrointestinal simulada (Granado et al., 2007).

Componentes	Salivar	Gástrico	Duodenal	Bilis
<b>Disoluciones inorgánicas (para 50 mL)</b>	1mL KCl 89,6g/L	0,92mL KCl 89,6g/L	0,63mL KCl 89,6 g/mL	
	1mL KSCN 20g/L	0,83mL HCl 37%(g/g)	4mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7g/L	3mL NaCl 175,3g/L
	1mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8g/L	0,3mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8g/L	1mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8g/L	6,83mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7g/L
	170μL NaCl 175,3g/L	1,57mL NaCl 175,3g/L	4mL NaCl 175,3g/L	0,42mL KCl 89,6g/L
	180μL NaOH 40g/L	1,8mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2g/L	1mL MgCl <sub>2</sub> 5g/L	20μL HCL 37%(g/g)
<b>Disoluciones orgánicas (para 50 mL)</b>		1mL NH <sub>4</sub> Cl 30,6g/L	18μL HCl 37%(g/g)	
		0,34mL urea 25g/L		
	0,8mL Urea 25g/L	1mL Glucosa 65g/L	0,4mL urea 25g/L	1mL urea 25g/L
		1mL ácido glucurónico 2g/L		
		1mL glucosamina 33g/L		
<b>Mezcla de ambas disoluciones y adición de:</b>				
	0,1mL α-amilasa	0,1g BSA	0,9mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,18g BSA
	1,5 mg ácido úrico	0,1g pepsina	22,2g/L	0,6g bilis
	5 mg mucina	0,3g mucina	0,1g BSA	1mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22,2g/L
			0,3g pancreatina	
<b>pH</b>	<b>6,5 ± 0,2</b>	<b>1,07 ± 0,07</b>	<b>7,8 ± 0,2</b>	<b>8,0 ± 0,2</b>

Se pesan alrededor de 20 g de bebida, se añaden 9 mL de jugo salivar manteniendo el matraz durante 5 minutos en un baño de agua a 37°C y 95 oscilaciones por minuto (SS40-2, Gran Instruments). Se adicionan 13,5 mL de jugo gástrico manteniendo la muestra 1h en dicho baño. Se añaden 25 mL y 9 mL de los jugos duodenal y bilis, respectivamente. El pH de esta disolución final se debe ajustar próximo a la neutralidad (6,8 - 7,2) (pHmetro, GLP21, Crison) (con el fin de garantizar la actividad de los enzimas empleados. Se añade 1 mL de taurocolato sódico (19,9 g/L), 0,5 mL de colesterol esterasa (9,98 unidades (u)/mL), 0,1 mL de lipasa (326 u/mL), 50 µL colipasa (0,25 mg/mL), 28 µL Fosfolipasa A<sub>2</sub> (20000u/mL) y se mantiene en el baño durante 2h. Las muestras digeridas son centrifugadas a 4000 rpm durante 1h 30 min a 4°C (centrífuga GT422, Jouan). Las distintas FB de cada muestra son homogenizadas y alicuotadas en tubos falcon de 50 mL y se mantienen en congelación (-20°C) hasta su análisis.

### ***B.2 Determinación de esteroides vegetales en la fracción bioaccesible***

Se introduce una alícuota de 5 mL de la FB en un tubo Pyrex® de 25 mL. Se adicionan 400 µg de epicoprostanol (PI), 10 mL de hidróxido potásico 2N (solución metanólica + 0,05% BHT) y se mantiene en un baño de agua a 65°C durante 1 hora. Posteriormente, se prosigue como se ha descrito en el caso de la extracción de la fracción insaponificable de los POPs (ver apartado A.2).

El extracto se transfiere a un tubo cónico previamente tratado con reactivo silanizante y tras su derivatización como se ha indicado en el apartado A.1, se inyecta en GC-FID utilizando un cromatógrafo HRGC

5300 Megaserie (Carlo Erba Instruments) provisto de una columna CP-Sil 5 CB (100% dimetilpolisiloxane, Varian®). La temperatura del inyector y detector es de 325°C, el volumen de inyección de 1 µL y la relación de split: 1:11. El helio es el gas portador (75 kPa). El horno, inicialmente a 265°C, incrementa su temperatura hasta 280°C (0,5°C/min). Posteriormente, la temperatura aumenta hasta 325°C (4°C/min) durante 30 min.

### ***B.3 Determinación de óxidos de esteroides vegetales en la fracción bioaccesible***

Se introduce una alícuota de 10 mL de la FB en una botella Pyrex® de 50 mL. Se adicionan 4,95 µg de 19-hidroxicolesterol (PI), 20 mL de hidróxido potásico (solución metanólica + 0,05% BHT) 2N y se mantiene durante 18-20h en la oscuridad, a temperatura ambiente y bajo agitación orbital (150 rev/min). Posteriormente, se procede a la extracción del insaponificable como se ha indicado en el apartado A.2. La fracción insaponificable es purificada mediante SPE utilizando el método de Guadiola et al. (1995), como se ha indicado en el apartado A.2. Los POPs purificados son derivatizados mediante el procedimiento descrito por Sweeley et al. (1963) (ver apartado A.1) y, tras disolver el extracto en 40 µL de Hx, se inyecta 1 µL en un cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu) provisto de una columna capilar ZB-5 Zebron (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). La temperatura del inyector es 325°C (split 1:25), la de la fuente de 230°C y la de la *transfer line* de 210°C. El gas portador es He (46 kPa). El detector (0,95 kV) es un cuadrupolo y el modo de adquisición es en *full scan* (50 – 650 m/z). El horno, inicialmente a 250°C (1 min)

asciende a 280°C (0,8 min) y, posteriormente, a 310 (5°C/min) durante 12 min (**Método GC-MS**).

La identificación se realiza a partir de los espectros de masas obtenidos en *full scan* y monitorizados en modo SIM (utilizando el ion mayoritario de cada tipo de compuesto detectado). La cuantificación se realiza a partir de curvas de calibrado realizadas con disoluciones patrón de COPs utilizando los iones análogos a los POPs, que se indican en el **cuadro n° 20**.

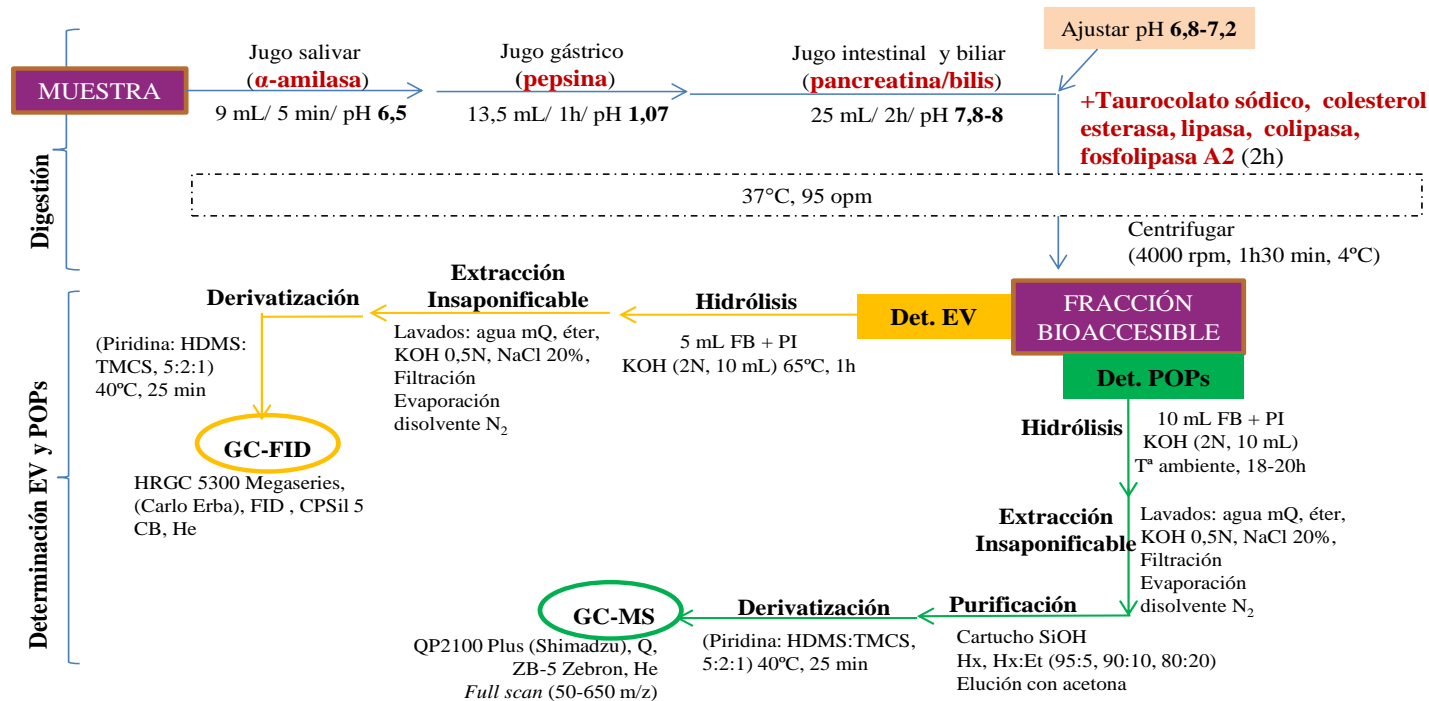
Cuadro n° 20. Curvas de calibrado utilizadas en la cuantificación de los óxidos de esteroides vegetales en fracciones bioaccesibles y los iones monitorizados (SIM) en cada caso.

<b>COPs</b>	<b>Ion COPs (m/z)</b>	<b>Ion POPs (m/z)</b>	<b>Recta de calibrado</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
7 $\alpha$ -hidroxi	456	484	3,094x - 0,0514	0,9983
7 $\beta$ -hidroxi	456	484	1,8462x - 0,0342	0,9992
$\beta$ -epoxi	384	412	0,666x + 0,0015	0,9885
$\alpha$ -epoxi	384	412	0,594x - 0,0012	0,9990
triol	403	431	0,6708x - 0,0058	0,9999
7-ceto	472	500	0,4631x - 0,0122	0,9976

COPs: productos de oxidación del colesterol, POPs: productos de oxidación de los esteroides vegetales, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación.

En la **figura n° 22** se muestra el esquema de determinación de EV y POPs en las fracciones de las bebidas a base de zumo y/o leche.

Figura n° 22. Esquema general de determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en las fracciones bioaccesibles de bebidas a base de zumo y/o leche.





## **C. Determinación de los efectos biológicos inducidos por los óxidos de esteroides.**

Para los ensayos con cultivos celulares se utilizan: la línea celular Caco-2 procedente de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; n° 86010202, Salisbury, UK), aisladas de un adenocarcinoma de colon humano de un adulto caucásico y la línea celular HepG2 procedente de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC; 58483209, Manassas, USA) aisladas de un adenocarcinoma de un adolescente caucásico.

### *Crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares Caco-2 y HepG2*

Las células se mantienen en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo, (DMEM-Glutamax) (Gibco) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino, 1 % v/v HEPES, 1 % v/v amino ácidos no esenciales, 1 % v/v de disolución de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y 0,05 % fungizona a pH 7,2-7,4. Los frascos se mantienen en un incubador (NH-4500E, Nuair) a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad relativa. El medio de cultivo se cambia cada dos días.

### **C.1 Citotoxicidad**

#### *C.1.1 Efecto dosis dependiente de los óxidos de esteroides*

El 7-cetoestigmasterol o el 7-cetocolesterol se disuelven en etanol para preparar el volumen necesario de disolución estándar a distintas concentraciones (30, 60, 120 µM) en medio de cultivo, (la concentración final de etanol no supera el 0,66%).

Cuando las células llegan a confluencia se despegan de la pared del frasco usando 5 mL de una disolución de tripsina-EDTA (2,5 g/L tripsina y 0,2 g/L de EDTA) previamente atemperada a 37°C y se resuspenden en el medio de cultivo.

Las células intestinales Caco-2 se siembran en placas de 24 pocillos (Costar) con una densidad de siembra de 50.000 células/cm<sup>2</sup>. Los ensayos se realizan a los 5 días post-siembra, una vez que el cultivo ha alcanzado la confluencia. El medio de cultivo se aspira y el cultivo celular es pre-incubado (37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 95% humedad relativa) con diferentes concentraciones (30, 60, 120 µM) de 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol durante diversos periodos de tiempo (4, 12 y/o 24h). Transcurrido ese tiempo, el medio se retira y se determinan los diferentes parámetros de citotoxicidad. Paralelamente, los cultivos se tratan con la misma concentración de etanol (0,66%) (control).

Las células hepáticas HepG2 se siembran en placas de 24 pocillos con una densidad de siembra de 200.000 células/pocillo. Los ensayos se realizan a las 24h post-siembra. El medio de cultivo se aspira y el cultivo celular es pre-incubado (37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 95% humedad relativa) durante 24h con 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol a tres concentraciones (30, 60, 120 µM). Transcurrido ese tiempo, el medio se retira y se determina el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Paralelamente, los cultivos se tratan con la misma concentración de etanol (0,66%) (control).

#### *C.1.1.1 Actividad en el lisosomal (Test de Rojo Neutro)*

El rojo neutro es un colorante captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y, en la medida que la célula pierde

viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa, se libera al medio, pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior (Repetto et al., 2008).

Se adiciona 1 mL de una disolución de colorante rojo neutro en disolución fosfato tamponada (PBS, pH=7,4) (1/10) al cultivo celular Caco-2 pretratado con los 7-cetoesteroles y se incuba durante 1h a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 95% de humedad relativa. Transcurrido este tiempo, se añade 1 mL de una disolución acuosa (milliQ) con 50% de etanol y 1% de ácido acético, se homogenizan los pocillos con agitación orbital y se mide su absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro UV/visible Lambda 2, Perkin Elmer). Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia respecto al control.

#### *C.1.1.2 Funcionalidad mitocondrial (Test MTT)*

La funcionalidad de las mitocondrias se evalúa con el test MTT que proporciona una medida parcial del metabolismo energético celular, dado que la conversión del MTT está catalizada por las deshidrogenasas acopladas al proceso de fosforilación oxidativa. La capacidad de las células para reducir el anillo de tetrazolio del MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil tetrazolio bromuro) dando lugar a cristales de formazán, constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, siendo interpretado como una medida de la toxicidad de los compuestos utilizados. Estos cristales, solubles en isopropanol ácido, dan lugar a una disolución púrpura (Ekmekcioglu et al., 1999).

Se adiciona 1 mL de disolución de MTT (0,5 mg/mL) en PBS al cultivo celular Caco-2 pretratado con los 7-cetoesteroles y se incuba

durante 1h (37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 95% humedad relativa). Transcurrido este tiempo, se retira esta disolución, se recogen los cristales de formazán con 1,5 mL de 2-propanol ácido (0,1N HCl, triton (0,1% p/v)) y se mide la absorbancia a 570 nm frente a aire, corrigiendo el valor obtenido con la sustracción de fondo a 690 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia respecto al control.

### *C.1.1.3 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )*

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial asociados a la integridad de dicha membrana se evalúan monitorizando la acumulación de 123-dihidrorodamina (DHR) en la matriz mitocondrial de células viables (Cai et al., 2000). El estudio está basado en la naturaleza lipófila del catión DHR el cual, por difusión pasiva, atraviesa la membrana externa mitocondrial y se hidroliza en la matriz liberando el compuesto fluorescente. Cuando el tratamiento altera la integridad de la membrana interna mitocondrial, ésta se permeabiliza liberándose el compuesto fluorescente. Los cambios en el  $\Delta\Psi_m$  constituyen un signo temprano de la activación de procesos de apoptosis celular.

Previamente a la medida del  $\Delta\Psi_m$ , se procede a la calibración del citómetro de flujo mediante distintos controles de marcaje celular (sondas fluorescentes). En primer lugar, se adiciona a cada pocillo una disolución de tripsina-EDTA y, tras mantenerla durante 1 min, se retira y se incuba la placa a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 95% humedad relativa (2 min). Se despega la monocapa de uno de los pocillos (no pre-incubado con ninguno de los 7-cetoesteroides ni marcado con tinción fluorescente) con 500  $\mu$ L de PBS que se utiliza como control para localizar la población celular. A continuación,

se adiciona a otro de los pocillos (no tratado con 7-cetoesteroles) 300  $\mu\text{L}$  de una disolución de DHR 5  $\mu\text{M}$  para localizar la población marcada con DHR debido al metabolismo basal de la célula (color verde). Por otra parte, a otro pocillo (no tratado con analitos) se le añade 300  $\mu\text{L}$  de una disolución de yoduro de propidio (IP) para poder localizar la población celular marcada con IP (necrótica) en el ensayo (color rojo).

Al resto de pocillos (tratados con las diferentes concentraciones de 7-cetoesteroles) se les añaden 300  $\mu\text{L}$  de la disolución de DHR y se dejan marcar durante 15 min. Posteriormente se adicionan 300  $\mu\text{L}$  de la disolución de IP y se marcan durante 15 min. Se homogeniza el pocillo con el fin de recoger la población celular ya marcada y se transvasa a tubos de citómetro, los cuales se agitan en vortex (MS2 Minishaker, IKA®) para, posteriormente analizar la fluorescencia en un citómetro de flujo (Coulter, EPICS XL-MCL, Miami, USA) (longitudes de onda de DHR  $\lambda_{\text{excitación}} = 488 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}} = 525 \text{ nm}$ ; IP  $\lambda_{\text{excitación}} = 488 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}} = 620 \text{ nm}$ ). Los resultados se expresan como porcentaje de población celular positiva para IP con respecto a la población celular positiva para DHR.

#### *C.1.1.4 Ciclo celular*

El ciclo celular describe la secuencia cíclica de procesos de la vida de la célula eucariota, que consta de dos periodos denominados interfase (a su vez constituido por tres fases: G1, S y G2) y mitosis (fase M). Las fases G1 y G2 se caracterizan por la síntesis de proteínas y ARN, la fase S por la replicación del ADN y la fase M es en la que tiene lugar la división celular.

El procedimiento experimental se basa en la unión del IP al ADN de doble cadena cuyo contenido puede estimarse en cada una de las etapas del ciclo biológico celular mediante el análisis con técnicas de citometría de flujo.

Tras el tratamiento de las células intestinales con las diferentes concentraciones de 7-cetoesteroles durante 24h, se adicionan al cultivo 0,5 mL de una disolución IP (citrato sódico pentahidratado 0,1 % (p/v), RNasa 0,1 % (p/v), triton 0,1 % (p/v), IP 0,005 % (p/v)) y se incuba durante 2h a 4°C. Posteriormente se homogeniza y la fluorescencia se analiza por citometría de flujo (Coulter, EPICS XL-MCL, Miami, USA) ( $\lambda_{\text{excitación}} = 536 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}} = 617 \text{ nm}$ ).

#### *C.1.1.5 Análisis citoquímico de ácidos nucleicos (ADN y ARN)*

El ciclo celular comprende los cuatro períodos mencionados en el apartado anterior (G1, S, G2, M). La citometría de flujo permite contar y caracterizar células determinando algunas de sus características físicas, tales como su tamaño y su estructura interna. Con el fin de obtener información más selectiva del contenido de ácidos nucleicos en las células de estudio, se utilizan fluorocromos selectivos de unión a ADN (Hoechst 33342) y a ARN (Pironina Y) (Darzynkiewicz, 1994).

Tras el tratamiento de las células intestinales con las diferentes concentraciones de 7-cetoesteroles durante 24h, se despega la monocapa con una disolución de tripsina-EDTA, se recogen las células con 1 mL de una disolución de PBS en etanol absoluto (1:3, v/v) y, tras centrifugar (1500 rpm, 3 min) (5810R, Eppendorf), se elimina el sobrenadante por decantación. Se adicionan 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de Hoechst 33342 de

concentración 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se mantiene a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se añaden 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de Pironina Y (concentración 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se mantiene a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se analiza mediante citometría de flujo (Modular Flow high-performance cell sorter- MoFlo Cell Sorter, DakoCytomation).

### *C.1.2 Evaluación del efecto conjunto de los 7-cetoesteroles*

El 7-cetoestigmasterol, el 7-cetocolesterol o el estigmasterol se disuelven en etanol para preparar el volumen necesario de disoluciones estándar individuales y mezclas dos a dos (120  $\mu\text{M}$  de cada uno) en medio de cultivo, (la concentración final de etanol no supera el 0,66%).

El cultivo celular (Caco-2 o HepG2) en las mismas condiciones de siembra indicadas para los ensayos dosis dependiente (apartado C.1.1) es pre-incubado (37°C/ 5%  $\text{CO}_2$ / 95% humedad relativa) con diferentes disoluciones estándar o asociaciones: 7-cetoestigmasterol + 7-cetocolesterol, estigmasterol + 7-cetoestigmasterol o estigmasterol + 7-cetocolesterol (120 de cada uno  $\mu\text{M}$ ) durante 24h. Los efectos se comparan con los observados tras la incubación de los cultivos celulares con los compuestos individuales (120  $\mu\text{M}$ ). En estos ensayos se utilizan cultivos control expuestos a 0,66% de etanol. Transcurrido ese tiempo, el medio se retira.

Se ha observado que la mitocondria es la principal diana celular relacionada con la citotoxicidad de estos compuestos. Por ello, se ha evaluado el  $\Delta\Psi_m$  (apartado 1.1.3), el ciclo celular (apartado 1.1.4) así

como el contenido relativo de ARN y ADN (apartado 1.1.5) tras el tratamiento con las diferentes mezclas analizadas.

### ***C.2 Efecto de los óxidos de esteroides sobre la expresión relativa de transportadores y enzimas involucrados en la homeostasis del colesterol***

Con el fin de poder determinar el mecanismo de acción inducido por los 7-cetoesteroides estudiados, se han evaluado los cambios en los niveles de expresión de diferentes transportadores y enzimas involucrados en la homeostasis lipídica en células del epitelio intestinal (Caco-2), tras su exposición a 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol, considerando una concentración que, sin llegar a ser tóxica, represente un cierto estrés para el cultivo celular, y un tiempo de incubación que permita evaluar la expresión génica de transportadores y enzimas estudiados.

Se han evaluado los niveles de expresión (ARNm) del transportador NPC1L1, proteína relacionada con la internalización de esteroides, las proteínas ABCG5/G8, responsables de la excreción de estos compuestos, la ACAT, involucrada en la esterificación de esteroides (para su incorporación a los quilomicrones) y la HMGCoA, relacionada con la síntesis endógena del colesterol. Se han monitorizado los cambios observados en dichos niveles de expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (LightCycler® 480 Real-Time PCR System, Roche). Paralelamente, se han analizado posibles alteraciones en la membrana mitocondrial mediante la evaluación de  $\Delta\Psi_m$  como punto final de citotoxicidad.



### *C.2.1. Exposición de los cultivos a los compuestos estudiados*

Se han utilizado distintos inhibidores capaces de: a) alterar la homeostasis del retículo endoplásmico (5  $\mu\text{M}$  de bradiquinina), b) inhibir el complejo I de la cadena de transporte electrónico, frenando tanto la síntesis equivalentes reductores como la producción de ATP (5  $\mu\text{M}$  de rotenona), o c) incidir sobre el complejo IV de la cadena de transporte electrónico inhibiendo la síntesis de equivalentes reductores (1  $\mu\text{M}$  de oligomicina-A). Las células intestinales (50.000 células/cm<sup>2</sup>), no pre-tratadas o pre-tratadas con diferentes inhibidores, son incubadas con 7-cetoestigmasterol o 7-cetocolesterol (60  $\mu\text{M}$ ) durante 3h. Paralelamente se preparan controles expuestos a etanol (0,66%) o a los inhibidores.

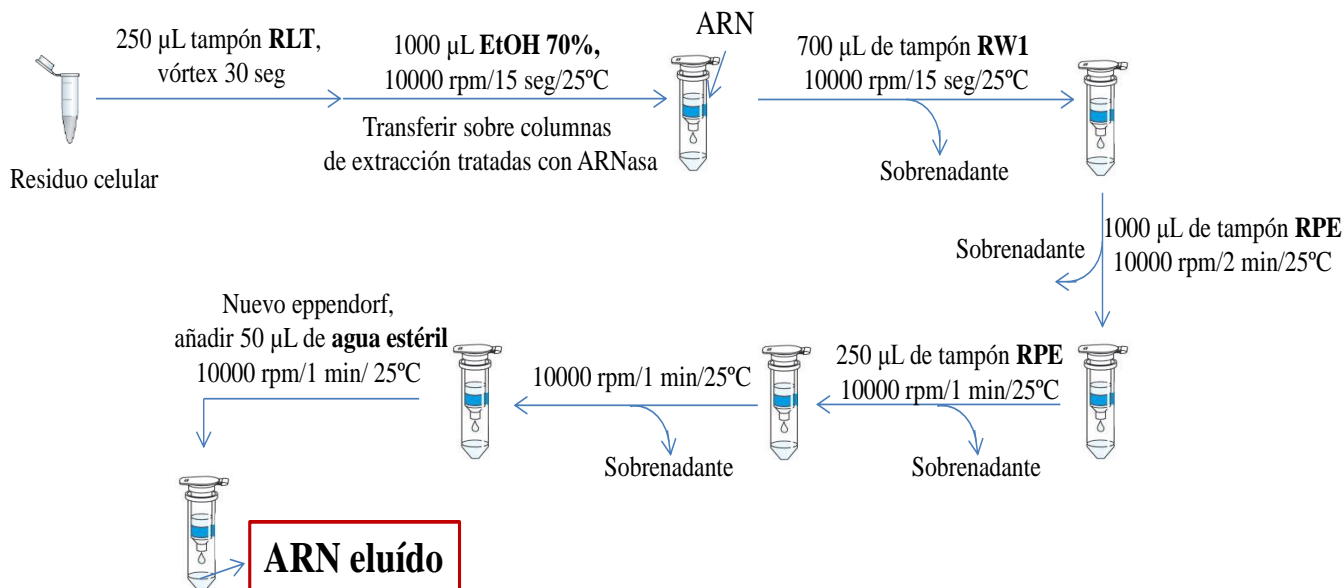
### *C.2.2 Monitorización de la expresión relativa mediante PCR*

Para realizar la determinación por PCR el primer paso es la extracción y purificación del ARN celular, seguido de la transcripción reversa y, por último, la amplificación y detección. Tras los distintos tratamientos de los cultivos celulares, el ARN total es extraído de los cultivos celulares utilizando el kit RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los cultivos celulares se recogen con 250  $\mu\text{L}$  del tampón RTL (lisis celular), se transfieren a eppendorfs y se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El residuo celular se atempera y se mezcla agitando con vórtex (30 seg) para producir la lisis celular. Se adicionan 1000  $\mu\text{L}$  de etanol (70%) y se centrifuga a 10000 rpm/15 seg/25  $^{\circ}\text{C}$ . Se deposita toda la disolución sobre las columnas de extracción de ARN tratadas con ARNasa. Una vez fijado el RNA se lava con 700  $\mu\text{L}$  de tampón RW1 y se centrifuga 10000 rpm/15 seg/25 $^{\circ}\text{C}$ ,

desechando el sobrenadante. Posteriormente, se adicionan 1000  $\mu\text{L}$  de tampón RPE, se centrifuga 10000 rpm/2 min/25°C y se descarta el disolvente eluido. Se vuelve a lavar con 250  $\mu\text{L}$  de tampón RPE, centrifugando a 10000 rpm/15 seg/25 °C y eliminando el sobrenadante. Se vuelve a centrifugar utilizando las mismas condiciones que en la etapa precedente para eliminar posibles restos de los tampones utilizados. Finalmente, se añaden 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril en el centro de la membrana de la columna de extracción y se centrifuga durante 1 min a 10000 rpm para eluir el ARN en el sobrenadante y guardándolo a -20°C hasta su uso. En la **figura n° 23** se muestra un esquema del modo operatorio seguido para la extracción del RNA celular. La concentración de ARN se determina midiendo la absorbancia a 260 nm (con sustracción a 280 nm) en un espectrofotómetro UV/visible de microvolúmenes (Nanodrop 2000C). A partir de 2  $\mu\text{g}$  de ARN, el ADNc se sintetiza por transcripción mediante un kit comercial (AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, USA)). La PCR se lleva a cabo con primers diseñados para los biomarcadores de interés (NPC1L1, ABCG5, ABCG8, HMGC0A, ACAT). El volumen final es de 20  $\mu\text{L}$  (2,5 $\mu\text{L}$  de ADNc, 7,5  $\mu\text{L}$  of SybR Green *buffer* (fluoroforo), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer y 9  $\mu\text{L}$  de agua estéril). El programa de la PCR consiste en 1 ciclo de desnaturalización a 95°C (5 min), 40 ciclos de amplificación a 60°C (20s) y 72°C durante 45s utilizando el sistema LightCycler 480 (Roche).

La señal de fluorescencia de cada gen se normaliza frente a un gen control ( $\beta$ -actina). La cuantificación relativa de los genes diana se calcula mediante un método matemático propuesto por Livak and Schmittge. (2001) ( $2^{-\Delta\text{Cp}}$ ).

Figura n° 23. Extracción de ARN de los cultivos celulares Caco-2.



### ***C.3 Efecto de los óxidos de esteroides sobre biomarcadores de inflamación***

#### *C.3.1 Monitorización de la expresión relativa mediante PCR*

El ARNm de los cultivos celulares Caco-2 expuestos a 7-cetoestigmasterol o 7-cetoestigmasterol (60  $\mu$ M, 3h), se ha utilizado para la monitorización de la expresión relativa de diversos biomarcadores de inflamación (TNF- $\alpha$ , receptor IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B) mediante PCR (como se ha indicado en el apartado C.2.1).

#### *C.3.2 Producción de citoquinas en células Caco-2*

Se ha cuantificado la secreción de diversas citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8) o anti-inflamatorias (IL-10) mediante inmunoensayos (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

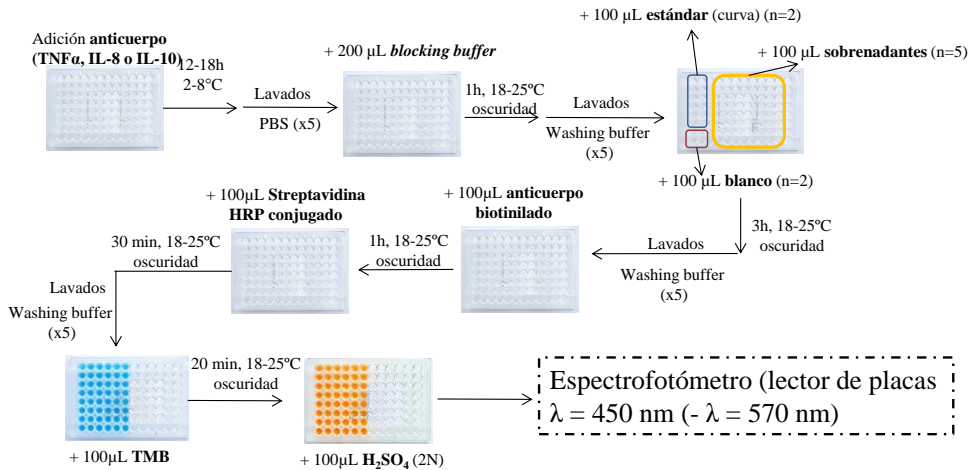
##### *C.3.2.1 Determinación de TNF $\alpha$ , IL-8 y IL-10*

La determinación de TNF $\alpha$ , IL-8 y IL-10 se realiza de modo similar y siguiendo instrucciones del fabricante. Brevemente, se añade el anticuerpo diluido con el *coating buffer* (1:100, v/v) a cada uno de los pocillos de la placa utilizada, se cubre con papel de aluminio y se incuba toda la noche en una refrigeración (2-8°C) para inmovilizar el anticuerpo en la superficie del pocillo. Transcurrido este tiempo, los pocillos tratados se lavan (5 veces) con PBS descartando la totalidad del contenido de la placa de golpe. Se adicionan 200  $\mu$ L del *blocking buffer* a cada pocillo, se cubre la placa con papel de aluminio y se incuba durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente (18-25°C). Se lavan los pocillos con el *washing buffer* (5 veces), descartando

el contenido de la placa de golpe. Paralelamente se preparan diferentes curvas de calibrado para las citoquinas cuantificadas (TNF $\alpha$  (7,8-500 pg/mL), IL-8 (1,6-240 pg/mL), IL-10 (2-300 pg/mL)) mediante diluciones seriadas. Se depositan en la placa 100  $\mu$ L de los sobrenadantes obtenidos tras la exposición de los cultivos celulares a los compuestos estudiados (n=5), las disoluciones para la elaboración de la recta de calibrado (n=2) y un blanco del *dilution buffer* (n=2) utilizado para la preparación de las mismas. Se cubre la placa con papel de aluminio y se incuba durante 3h a T<sup>a</sup> ambiente (18-25°C). Se lavan los pocillos con el *washing buffer* (5 veces), como se ha indicado anteriormente. Se diluye el anticuerpo biotinilado con el *dilution buffer* (1:200, v/v) según se indica en el procedimiento experimental y se añaden 100  $\mu$ L a cada uno de los pocillos, incubándose 1h a T<sup>a</sup> ambiente (18-25°C). Se lava de nuevo la placa con el *washing buffer* (5 veces). Posteriormente, se diluye la Streptavidina-HRP conjugada con el *dilution buffer* (1:250, v/v) y se adicionan 100  $\mu$ L a cada pocillo. Se cubre la placa con papel de aluminio y se incuba durante 30 min a T<sup>a</sup> ambiente (18-25°C). Se lava de nuevo la placa con el *washing buffer* (5 veces). Se añaden 100  $\mu$ L/pocillo de TMB y se incuba durante 20' a T<sup>a</sup> ambiente (18-25°C). Finalmente se adicionan 100  $\mu$ L/pocillo de una disolución de ácido sulfúrico (2N) para detener la reacción y se mide la absorbancia con ayuda de un lector de placas UV/visible a  $\lambda = 450$  nm con corrección a  $\lambda = 570$  nm (Multiskan EX, Thermo). La concentración de citoquinas se obtiene mediante la interpolación de la absorbancia obtenida a partir de dichos sobrenadantes en la curva de calibrado obtenida al representar el  $\log_{\text{concentración}}$  frente al

$\log_{\text{abs450-abs 570}}$ . El esquema de determinación de estas citoquinas mediante ELISA se detalla en la **figura n° 24**.

Figura n° 24. Determinación de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10) en sobrenadantes de cultivos celulares Caco-2.



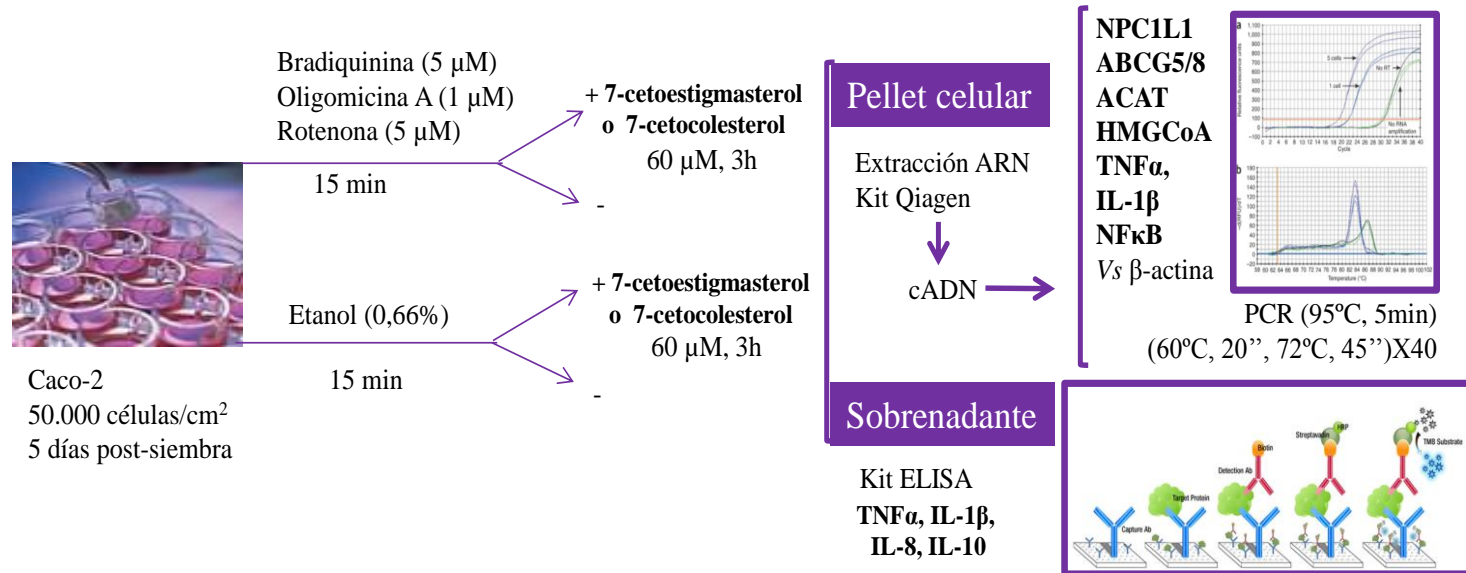
### C.3.2.2 Determinación de IL-1 $\beta$

La determinación IL-1 $\beta$  se lleva a cabo mediante el procedimiento experimental estipulado por el fabricante. En este caso, el anticuerpo de la citoquina cuantificada se encuentra inmovilizado en la placa comercial. Se preparan una curva de calibrado (15,6 - 250 pg/mL) por diluciones seriadas del estándar de IL-1 $\beta$ . Se adicionan 100  $\mu$ L/pocillo de cada una de las disoluciones estándar preparadas (n=2), de muestras (n=5), de un control positivo (n=2) y del blanco del disolvente utilizado en la realización de las diluciones (n=2). Se adicionan 50  $\mu$ L de anti IL-1 $\beta$  biotinilado, se cubre la placa con una lámina de plástico y se incuba durante 3h a T<sup>a</sup> ambiente (18-25°C). Se lava la placa con un *washing*

*solution* (3 veces). Se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de Sterptavidina-HRP por pocillo y se incuba durante 30 min a T<sup>a</sup> ambiente (18-25°C). Transcurrido este tiempo, se repite la etapa de lavado. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de TMB y se incuba la placa en la oscuridad durante 20 minutos. Finalmente, se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico (2N) para detener la reacción. La absorbancia se determina mediante un espectrofotómetro a 450 nm con la correspondiente sustracción a 620nm. La concentración de IL-1 $\beta$  se obtiene mediante la interpolación de la absorbancia obtenida a partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares en la curva de calibrado.

El diseño experimental de la determinación de la influencia de los 7-cetoesteroles en el metabolismo del colesterol y su efecto en la producción de citoquinas en los cultivos Caco-2 se muestra en la **Figura n° 25**.

Figura nº 25. Procedimiento experimental para evaluar la influencia de los 7-cetoesteroles en el metabolismo del colesterol y en la producción de citoquinas.





## D. Obtención de óxidos de esteroides vegetales

Dada la escasez de POPs comercializados (actualmente solo existe el 7-cetoestigmasterol), se han obtenido los principales POPs por termooxidación y posterior separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### D.1. Termooxidación

Se han utilizado dos métodos de termooxidación para la obtención de POPs.

- *Método A:* 100,9 mg de un patrón de EV ( $\beta$ -sitosterol 78,7% (p/p) y restos de campesterol y sitostanol que pueden llegar a sumar el 100%) se termooxidan de acuerdo a la metodología descrita por Conchillo et al. (2005) explicada previamente en el apartado A.2 (*identificación y cuantificación*).

- *Método B:* 23 mg del patrón de EV se depositan en una placa Petri y se mantiene en estufa a 130°C durante 24h. El residuo se recoge con 10 mL de Hx:éter (90:10, v/v) (Koschutning et al, 2010).

### D.2. Purificación

Los patrones termooxidados por ambos métodos se purifican mediante SPE. La purificación se realiza utilizando 72 g de gel de sílice (0,2–0,5 mm) (Lampi et al., 2002, Apprich and Ulberth, 2004), introducida en una columna de vidrio y previamente activada con 150 mL de heptano. Tras deposición de la muestra, las interferencias son eliminadas con 150 mL de heptano:éter (90:10, v:v) y 450 mL de

heptano:éter (50:50, v:v), eluyendo los POPs se con 150 mL de acetona (tiempo de purificación 3h) (4,2 mL/min). Esta última fracción se evapora y, tras disolver el extracto en 3 mL de heptano:Ip (93:7, v:v), es filtrado sobre filtros Millex-FH (4 mm, 0,45 µm) y se inyecta en HPLC preparativa.

### ***D.3. Determinación por HPLC***

La separación de los POPs por HPLC preparativa se basa en el procedimiento descrito por Koschutnig et al. (2010). El equipo es Dionex (Ultimate 3000) provisto de una bomba Ultimate 3000. Las condiciones cromatográficas utilizadas son: columna de sílice Supelcosil (250 mm x 21,1 mm, 12 µm), detector UV ( $\lambda = 206$  nm) (Ultimate 3000), fase móvil heptano:Ip (93:7, v/v), flujo de 17 mL/min y volumen de inyección de 2 mL. Se recogen fracciones en tubos previamente tarados, a los tiempos donde se detecta elución de compuestos (a: 7,1 min, b: 9,9 min, c: 11,9 min, d: 13,9 min y e: 14,8 min). Se evapora el disolvente y se pesa el residuo. Tras la dilución del compuesto con Hx:Ip (3:2, v/v), se toma 1 mL y se derivatiza mediante el método de Sweeley et al. (1963) (ver apartado A.1), y se cuantifican los POPs identificados por GC-MS utilizando las condiciones cromatograficas descritas en el apartado A.1. (**Método GC-MSB**).

### ANEXO III. Reactivos y disoluciones

#### Reactivos

- 1,2,3-dihidrorhodamina, Sigma (95%).
- 19-hidroxicolesterol, Steraloids (98%).
- 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB), Sigma.
- 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, Steraloids (> 98%).
- 7-cetocolesterol, Sigma (> 90%).
- 7-cetoestigmasterol, Steraloids (98,6%).
- $\alpha$ -amilasa de saliva humana Type XIII-A (108 u/mg sólido), Sigma.
- $\beta$ -epoxicolesterol, Sigma (98%).
- $\beta$ -sitosterol, Steraloids (95%).
- $\beta$ -sitosterol, Fluka (78,7%).
- Acetona, Merck (99%).
- Ácido acético, Merck (99,8%).
- Ácido clorhídrico fumante, d: 1,19 g/ml, Merck (37%).
- Ácido glucurónico, Sigma.
- Ácido sulfúrico, Merck (95%).
- Ácido úrico, Merck.
- Agua desionizada Milli-Q plus, Millipore.
- Agua grado cultivo celular (AGCC). Agua para irrigación, Braun.
- Albúmina bovina sérica (BSA), Sigma.
- Aminoácidos no esenciales, Gibco.
- AMV reverse transcriptase (10 u/ $\mu$ L), Promega (M5101).
- Antibióticos (penicilina/estreptomicina), Gibco.
- Azul tripán (0,4% p/v en PBS), Sigma.

- Brasicasterol, Steraloids (98,6%).
- Butilhidroxitolueno (BHT), Sigma (99%).
- Bicarbonato sódico, Merck (99,5%).
- Bilis bovina, Sigma.
- Bradiquinina (acetato), Sigma.
- Campesterol, Steraloids (98,6%).
- Citrato trisódico, Sigma.
- Cloroformo, Merck (99%).
- Cloruro amónico, Merck.
- Cloruro cálcico dihidratado, Sigma.
- Cloruro magnésico, Sigma.
- Cloruro potásico, Merck.
- Cloruro sódico, Merck.
- Coating *buffer* powder (ELISA/ELISPOT) (eBioscience, 00-0044-59), para redisolver en 1 L de agua milliQ (pH = 9,6).
- Colesterol esterasa de páncreas bovino (422 u/g proteína), Sigma.
- Colipasa de páncreas porcino, Sigma.
- Colorante Hoescht 33242, Sigma.
- Dilution buffer: PBS con 1 % de BSA y 0,05% de Tween-20.
- Dimetisulfóxido (DMSO), Sigma.
- dNTPs (desoxinucleótidos), Promega.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (glucosa 1g/L), Gibco.
- Epicoprostanol, Sigma (95%).
- Estigmastanol, Sigma (97,4%).
- Estigmasterol, Sigma (95%).

- Etanol, Merck ( $\geq 99,5\%$ ).
- Éter dietílico, Merck (99,7%).
- Fosfato hidrógeno potásico, Sigma.
- Fosfato hidrógeno sódico, Sigma.
- Fosfolipasa A<sub>2</sub> de páncreas porcino (200 u/mg proteína), Sigma.
- Fungizona, Gibco.
- Glucosa, Sigma.
- Glucosamina hydrochloride, Sigma.
- HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico), Gibco.
- Heptano, Scharlau (98,3%).
- Hexametildisilizano (HDMS), Sigma.
- Hexano, Scharlau (98,3%).
- Hidróxido potásico, escamas, Poch ( $> 85\%$ ).
- Hidróxido sódico, escamas, Sigma (90%).
- Isopropanol, Merck ( $\geq 99,8\%$ ).
- Kit determinación IL-1 $\beta$ , human ELISA set, Bionova.
- Kit determinación IL-8, high sensitivity human ELISA Set Immunotools.
- Kit determinación IL-10 high sensitivity human ELISA Set, Immunotools.
- Kit determinación TNF- $\alpha$ , high sensitivity human ELISA Set, Immunotools.
- Lipasa de páncreas humano (500 u/mg proteína), Sigma.
- Metanol, Merck (99%).

- MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil tetrazolio, Sigma.
- Mucina, de estómago porcino tipo II, Sigma.
- Oligomicina A, Sigma.
- Pancreatina de páncreas porcino, Fluka.
- PBS (cloruro sódico 140 mM; cloruro potásico 2,7 mM; hidrógeno fosfato sódico 6,4 mM; dihidrógeno fosfato potásico 1,5 mM, pH=7,4). Disolución fosfato tamponada, Gibco.
- Pepsina de mucosa de estómago porcino, actividad 890 unidades / mg de proteína, Sigma.
- Pironina Y, Sigma.
- Piridina (Sylation grade), Fluka.
- RNasa A, Sigma.
- Rojo neutro, Sigma.
- Rotenona, Sigma.
- Streptavidina HRP conj “Ready set to go!”, eBioscience.
- Suero bovino fetal, Gibco.
- Sulfato de magnesio, Sigma.
- Sulfato de sodio anhidro granulado grueso 0,63-2,0 mm, Merck.
- Tampón RLT, Qiagen.
- Tampón RPE concentrado, Qiagen.
- Tampón RW1, Qiagen.
- Tampón Sybr Green (fluorocromo), Sigma.
- Tampón TRIS, Sigma.
- Taurocolato sódico, Sigma ( $\geq 95\%$ ).

- Tiocianato de potasio, Sigma.
- Trimetilclorosilano (TMCS), Carlo Erba.
- Tripsina (2,5 g/L) – EDTA (0,2 g/L), Gibco.
- Tritón, Panreac.
- Tween-20, Sigma.
- Urea, Carlo Erba.
- Yoduro propidio, Sigma.

***Primers forward/reverse.***

$\beta$ -actina: GCCATTTTGGAGAAAGGACA  
CTCACATGGCACAAAACACC

ABCG5: CCCAAGGGACTCCGGGGTCA  
GACCCATGGACCCTCCGGGG

ABCG8: CTTCTACCTCGCCGGGGGCT  
CCGCGATGGTGAGGTTCCCG

ACAT: AGCCTTTCCTTGCTGCCAGCC  
TGCTCTCCATCCCACCTGCCA

HMGC<sub>o</sub>A: TGGCAGGACCCCTTTGCTTAGATGA  
GACGCACAACCTGGGCCACGAG

NF $\kappa$ B: ACAAATGGGCTACACCGAAG  
TAGGGCTTTGGTTTACACGG

NPC1L1: TCCGTGGAGTTCGTGTCCCACATTA  
TGGCACCAGCACCTTTGATAGAACC

Receptor IL-1 $\beta$ : CTGGCACGTTTGTGAGAAGA  
GTTTCCTTCAAGCAGGCAAAG

TNF $\alpha$ : CACCAGGTGTGATTCAGGTG  
CCCCACTGTGCTTTGTACCT

### Disoluciones

- 1,2,3-dihidrorodamina (2 mM): Se disuelven 2 mg DHR en 2,7 mL de DMSO. Posteriormente, se prepara una disolución 5  $\mu$ M de DHR en PBS.
- 19-hidroxicolesterol (0,0493 mg/mL). Se disuelven 5 mg en 10 mL de Hx:Ip (3:2, v/v) y 1 mL de esta disolución en 10 mL de Hx:Ip (3:2, v/v).
- $\alpha$ -amilasa de saliva humana. Se reconstituye la totalidad del envase (46,3 mg) (108 u/mg sólido) en 25 mL 1mM CaCl<sub>2</sub> (0,0147 g en 100 mL de agua estéril). Se almacena en congelación en atmósfera de nitrógeno.
- Ácido sulfúrico (2N). Se pipetea 25,8 mL de ácido sulfúrico (95%) y se disuelven en agua milliQ (250 mL).
- *Blocking buffer*. Preparar el volumen necesario de PBS con albúmina al 3% (p/v).
- Cloruro potásico 1M. Se disuelven 3,73 g en 50 mL de agua milliQ.
- Cloruro sódico al 20% (p/v). Se disuelven 50 g de NaCl en 250 mL de agua milliQ.
- Colesterol esterasa de páncreas bovino. Se disuelven 473,9 mg en 10 mL de tampón fosfato. Se almacena en congelación en atmósfera de nitrógeno.
- Colipasa de páncreas porcino. Se disuelven 0,5 mg en 2 mL de tampón TRIS. Se almacena en congelación en atmósfera de nitrógeno.
- *Dilution buffer*: PBS con BSA al 1% (p/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v).



- Disolución de Pironina Y (2 µg/ml). Se pesan 25 mg y se disuelven en 25 mL de agua milliQ (1mg/mL). Se toman 200 µL y se llevan a 100 mL con agua milliQ.
- Disolución etanólica: Preparar el volumen necesario de etanol disolviéndolo a la mitad con agua milliQ y con ácido acético con una concentración final de 1% (p/v).
- Disolución fijadora: Preparar el volumen necesario de una disolución 1:1 de PBS:etanol (v/v).
- Epicoprostanol (2 mg/mL). Se disuelven 50 mg de epicoprostanol en 25 mL de etanol.
- Fosfolipasa A<sub>2</sub> de páncreas porcino. Se disuelven 100 mg en 1 mM de tampón TRIS (~ 20000u/mL). Se almacena en congelación en atmósfera de nitrógeno.
- Hidróxido potásico 1N (metanólica): Se disuelven 2,8 g de KOH en 50 mL de metanol (al 0,05% de BHT) (estable máximo 48 h).
- Hidróxido potásico 2N (metanólica): Se disuelven 5,6 g de KOH en 50 mL de metanol (al 0,05% de BHT) (estable máximo 48 h).
- Hidróxido potásico 0,5N (acuosa): Se disuelven 1,4 g de KOH con 50 mL de agua MilliQ (al 0,05% de BHT) (preparar en el día).
- Hoescht 33342 (1 µg/ml). Se disuelven 25 mg del colorante en 25 mL de agua milliQ (1mg/mL). Se toman 100 µL y se llevan a 100 mL con agua milliQ.
- Isopropanol ácido (0,1 N HCl, 0,1 % p/v tritón). En un aforado de 200 mL se añaden 0,2 g de tritón, 1,65 mL de HCl fumante (37%) y se afora a 200 mL con isopropanol.

- Lipasa de páncreas humano. Se disuelven 4,2 mg de proteína en 6,45 mL de tampón TRIS. Se almacena en congelación en atmósfera de nitrógeno.
- Reactivo MTT: Se disuelven 15 mg de MTT en 3 mL de PBS. Posteriormente se diluye en proporción 1/10 (v/v) en PBS.
- Reactivo silanizante (piridina:HMDS:TMCS, 5:2:1 (v/v/v)). Se mezclan 50 mL de piridina y 20 mL de HMDS en una botella Pyrex de 100 mL y se agita bien. Se añaden rápidamente 10 mL de TMCS y se homogeniza la mezcla. Se deja reposar durante 1 semana (4°C) para eliminar el aspecto opaco (polvo en suspensión) que presenta la mezcla homogenizada.
- Rojo Neutro. Se diluye el reactivo en PBS en proporción 1/10 (v/v).
- *Washing buffer*. PBS con Tween-20 al 0,01% (v/v).
- Yoduro de propidio (0,05 mg/mL). Se disuelven 100 mg de citrato trisódico (1 mg/mL), 5 mg de yoduro de propidio, 100 mg de RNasa A (1 mg/mL) en 50 mL de agua milliQ. Se adiciona 0,1g de Triton (0,1% p/v) y se afora a 100 mL con agua milliQ (ensayo ciclo celular).
- Yoduro de propidio (0,05 mg/mL). Se disuelven 100 mg citrato trisódico (1 mg/mL), 5 mg de yoduro de propidio y 100 mg de RNasa A (1 mg/mL) en 100 mL de PBS (ensayo  $\Delta\Psi_m$ ).

**DFUSIÓN DE RESULTADOS**

***RESULTS DIFFUSION***





## Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources

Laia Alemany-Costa <sup>a,1</sup>, Marina González-Larena <sup>a,1</sup>, Guadalupe García-Llatas <sup>a,\*</sup>, Amparo Alegría <sup>a</sup>, Reyes Barberá <sup>a</sup>, Luis Manuel Sánchez-Siles <sup>b</sup>, María Jesús Lagarda <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot, Spain

<sup>b</sup> Research and Development Department, Hero Institute for Nutrition, Alcantarilla, Murcia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 March 2012

Accepted 2 May 2012

Available online 9 May 2012

#### Keywords:

Plant sterols

Phytosterol oxidation products

Gas chromatography

Phytosterol stability

Sterol oxidation

Functional foods

### ABSTRACT

Two different plant sterol (PS) sources (free PS from tall oil and esterified PS from vegetable oils) were used for manufacturing two types of functional beverages (fruit and milk-based fruit beverages), and their PS and phytosterol oxidation product (POP) contents were determined. Gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) was used for identification and gas chromatography–flame ionization detection (GC–FID) for quantitation purposes. Brassicasterol, campesterol, campestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and sitostanol were the quantified PS, conforming a profile in order with current legislation. The relative percentages of PS differed according to the enrichment source involved, though the enrichment levels (g/100 g beverage) were of the same order (1.77 from tall oil and 1.84 from vegetable oils). Only POPs from  $\beta$ -sitosterol (the prevalent PS in the analyzed beverages) were detected – the predominant representative being 7 $\beta$ -hydroxysitosterol (39–58.5% of total POP content). The following POPs were quantified: 7 $\alpha$ -hydroxy,  $\beta$ -epoxy,  $\alpha$ -epoxy, and 7-ketositosterol, yielding a total POP content ranging between 42.9 and 57.4 mg/100 g of PS. No statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) in total and individual POP content according to the source of PS were found. The mean  $\beta$ -sitosterol oxidation percentage was  $<0.07\%$ , which reflected a low PS oxidation extent, though manufacture was on a laboratory scale regardless of the PS source used in enrichment of the functional beverages. These functional drinks therefore can be regarded as healthy food products and as an adequate PS vehicle as well.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Consumption of foods enriched with plant sterols (PS) (including phytosterols and phytostanols) may help reduce low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels. PS consumption (2 g/day) results in a cholesterol reduction of approximately 9%, exerts beneficial effects upon other lipid variables and, in addition, PS have been described

as anti-inflammatory and anti-cancer compounds (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011; Hernández-Mijares et al., 2010; Marangoni & Poli, 2010).

Plant sterols intake with the diet ranges from 150 to 440 mg/day, and can reach 1 g/day in vegans (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). Since the diet alone is unable to offer the effective intake required to deliver the health benefits of PS, a large variety of commercial foods have been enriched with free or esterified PS, including spreads, which were the first commercial applications of PS-enriched foods. Since the approval of spreads in the European Union (EU), several more approvals have been issued for the addition of phytosterol to other food categories such as milk-based fruit beverages (European Food Safety Authority (EFSA), 2008). This kind of enrichment is a convenient and alternative way for consumers to obtain the daily recommended amount of PS for subjects with moderate hypercholesterolemia. In effect, these products can be regarded as healthy staple foods, since skimmed milk can be used for their formulation – thereby replacing milk fat with unsaturated fatty acids used in PS esterification. Furthermore, fruit juices can provide vitamins and antioxidants as well (Normen & Frohlich, 2004).

The main sources of PS for current functional foods and dietary supplements are tall oil, a by-product of the wood pulp industry, and vegetable oil deodorizer distillate. Tall oil contains a mixture of

*Abbreviations:* BHT, butylhydroxytoluene; COPs, cholesterol oxidation products; EU, European Union; Fb, fruit beverages; GC–FID, gas chromatography–flame ionization detection; GC–MS/MS, gas chromatography–tandem mass spectrometry; HMDS, hexamethyldisilazane; IS, internal standard; KCl, potassium chloride; KOH, potassium hydroxide; LDL, low-density lipoprotein; MfB, milk-based fruit beverages; POPs, phytosterol oxidation products; PS, plant sterols; Rf, response factor; SPE, solid-phase extraction; TMCS, trimethylchlorosilane; TMSE, trimethylsilyl ether.

\* Corresponding author at: Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Tel.: +34 963544907; fax: +34 963544954.

*E-mail addresses:* laia.alemany@uv.es (L. Alemany-Costa), marina.gonzalez@uv.es (M. González-Larena), guadalupe.garcia@uv.es (G. García-Llatas), amparo.alegría@uv.es (A. Alegría), reyes.barbera@uv.es (R. Barberá), luisma.sanchez@hero.es (L.M. Sánchez-Siles), m.j.lagarda@uv.es (M.J. Lagarda).

<sup>1</sup> Both authors have contributed equally to the study, and thus may be regarded as first author.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells

L. Alemany<sup>a</sup>, J.M. Laparra<sup>b</sup>, R. Barberá<sup>a</sup>, A. Alegría<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Nutrition and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain<sup>b</sup> Agrochemistry and Food Technology Institute, National Research Council, Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 March 2012

Accepted 24 June 2012

Available online 29 June 2012

## Keywords:

Plant sterol oxidation products

Caco-2 cells

Cytotoxic effects

7k-Stigmasterol

7k-Cholesterol

## ABSTRACT

The biological implications of cholesterol oxidation products have been investigated, though research on plant sterol oxidation products is scarce and in some cases contradictory.

The cytotoxicity of 7keto(k)-stigmasterol versus 7keto(k)-cholesterol at different concentrations (0–120 μM) and incubation times (4–24 h), in intestinal epithelial cells (Caco-2 cells) was evaluated. The 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide and neutral red uptake tests, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), and relative DNA and RNA contents in the cell cycle phases were determined. Possible interaction effects between 7k-derivatives or non-oxidized stigmasterol were monitored.

Endo/lysosomal activity was not impaired by either oxide. 7k-cholesterol showed a deleterious effect upon the mitochondrial compartment after 24 h of exposure (120 μM), as well as upon  $\Delta\Psi_m$  when incubated at all concentrations (12/24 h). Only cells incubated with 7k-cholesterol (120 μM) exhibited a decrease in RNA proportion in the G1 population. The presence of 7k-stigmasterol or stigmasterol with 7k-cholesterol reduced the deleterious metabolic effects upon mitochondrial functionality and integrity and the distribution of RNA contents in G1 and G2 phases. A decrease in the G1 phase proportion was detected in cells exposed to mixtures, without alterations in RNA content. The results obtained indicate the absence of 7k-stigmasterol cytotoxicity in Caco-2 cells and its capacity to reduce 7k-cholesterol toxicity.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Due to their known cholesterol-lowering effect, plant sterols are used in nutritional strategies to prevent coronary and cardiovascular risks (García-Llatas and Rodríguez-Estrada, 2011).

The structure of plant sterols is similar to that of cholesterol and, consequently, they are prone to oxidation during technological processes in food production and/or storage, leading to the formation of plant sterol oxidation products (POPs) with potential cytotoxic effects. There is evidence that cholesterol oxidation products (COPs) may be linked to the initiation and progression of several chronic diseases including atherosclerosis, neurodegenerative processes, diabetes, kidney failure and ethanol intoxication (Otaegui-Arrazola et al., 2010). However, research on biological

activities of POPs has been more limited, and the results in some cases have been contradictory (reviewed by Hovenkamp et al., 2008; Ryan et al., 2009; García-Llatas and Rodríguez-Estrada, 2011).

Previous studies have demonstrated qualitatively similar cytotoxic effects of POPs in different mammalian cell types, with differences in their susceptibility. Cholesterol oxidation products exert severe cytotoxic effects in the liver and favor the development of cardiovascular diseases – the intestinal epithelium being the first physiological barrier after the oral intake of these compounds. Acdox et al. (2001), in a cultured mouse macrophage cell line (C57BL/6) exposed to cholesterol oxides and oxides of  $\beta$ -sitosterol/campesterol mixture (200 μg/mL), reported similar patterns of toxicity in the form of reduced cell viability and mitochondrial dehydrogenase activity. However, the effects were less severe with the plant sterol oxides. The same conclusion was drawn by Maguire et al. (2003) in monocytic-U937 cells, after evaluating the cytotoxic effects of  $\alpha$ -epoxystosterol and a  $\beta$ -sitosterol thermooxidized mixture versus  $\beta$ -OH-cholesterol. Koschutnig et al. (2009), in hepatic-HepG2 cells, reported a decrease in cell viability when exposed to  $\beta$ -sitosterol oxides, but only 7k-sitosterol

Abbreviations: DHR, 1,2,3-dihydroamine; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide; COPs, cholesterol oxidation products; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium;  $\Delta\Psi_m$ , mitochondrial membrane potential; POPs, plant sterol oxidation products; PBS, phosphate buffered solution; PI, propidium iodide.

\* Corresponding author. Tel.: +34 963544907; fax: +34 963544954.

E-mail address: [amparo.alegria@uv.es](mailto:amparo.alegria@uv.es) (A. Alegría).



## Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages

Laia Alemany<sup>a</sup>, Antonio Cilla<sup>a</sup>, Guadalupe Garcia-Llatas<sup>a</sup>, Maria T. Rodriguez-Estrada<sup>b</sup>, Vladimiro Cardenia<sup>c</sup>, Amparo Alegria<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot (Valencia), Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Viale G. Fanin 40, 40127 Bologna (BO), Italy

<sup>c</sup> Interdepartmental Centre for Agri-food Industrial Research, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Piazza Goldanini 60, 47521 Cesena (FC), Italy

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 3 December 2012  
Accepted 9 February 2013  
Available online 1 March 2013

**Keywords:**  
Plant sterol  
Simulated gastrointestinal digestion  
Sterol oxidation products  
Beverages

### ABSTRACT

This study evaluates the bioaccessibility (percentage of soluble compound available for absorption) of plant sterols (PS) and their oxides (phytosterol oxidation products, POPs) after simulated gastrointestinal digestion in fruit (Fb), milk (M) and fruit-based milk beverages with (FbM<sub>+</sub>) or without (FbM<sub>-</sub>) tangerine juice. In beverages and their bioaccessible fraction (BF), campesterol, campestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and sitosterol were detected. Bioaccessibility of total PS ranged between 2.62 and 6.48%, FbM<sub>+</sub> yielding the highest value, followed by FbM<sub>-</sub> > Fb > M. Campesterol/campestanol were the most bioaccessible PS. Only oxides of  $\beta$ -sitosterol were detected in beverages and BF (7 $\alpha$ -hydroxy, 7 $\beta$ -hydroxy,  $\beta$ -epoxy,  $\alpha$ -epoxy, sitostanetriol and 7-ksitosterol). Bioaccessibility of total POPs ranged between 19.08 and 49.29%, sitostanetriol yielding the highest value. Bioaccessibility of POPs was higher than that of PS, suggesting different patterns of solubility for these compounds.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Low-fat milk (Saraiva, Castilho, Martins, Noronha da Silveira, & Ramos, 2011; Rideout, Chan, Harding, & Jones, 2009) or orange juice (Devaraj, Autret, & Jalal, 2006) enriched with 1–3 g/day of free or esterified plant sterols (PS) or stanols cause a significant decrease in serum total and LDL-cholesterol. Beverages, including fruit-skimmed milk beverages (where the addition of PS is allowed in the European Union) (European Commission Decision, 2004), are a convenient way for consumers to obtain the daily recommended amount of PS, because these products can be regarded as healthy staple foods.

One of the mechanisms by which PS can reduce cholesterol absorption is competition for space in mixed micelles in the lumen (Brufau, Canela, & Rafeecas, 2008). The molecular orientation is restricted by the fixed, long hydrophobic side-chain, which can be disadvantageous for fitting into the solubilization site. Thus, small differences in structure

among sterols can have a great influence on selective solubilization in bile salt micelles (Matsuoka, Kajimoto, Horiuchi, Honda, & Endo, 2010).

Like other unsaturated lipids, PS are prone to oxidation, giving rise to a group of compounds termed phytosterol oxidation products (POPs). In the literature, there are contradictory results concerning the potential biological effects of POPs (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011; Ryan, McCarthy, Maguire, & O'Brien, 2009). The source of these compounds (food processing, storage and *in vivo* metabolic formation) is difficult to establish. They can be absorbed in small quantities through the diet, but it is also possible that they could be readily metabolized. From a functional standpoint, it would be interesting to know not only the PS contents in foods but also their oxidative stability (POPs formation) and their bioaccessibility – the latter meaning the amount of an ingested compound that is available for absorption in the gut after digestion and use in physiological functions or storage (Fernandez-García, Carvajal-Lerida, & Perez-Galvez, 2009).

To the best of our knowledge, there are no studies addressing the effect of gastrointestinal digestion on sterols and their oxides in foods. However, different solubility patterns of sterols have been reported in diverse model dietary mixed micelles composed of a lipid matrix and glycodeoxycholate, taurodeoxycholate or taurocholate; such behavior was related to the nature and composition of the mixed micelles. In general, cholesterol is the most soluble sterol in mixed micelles, followed by  $\beta$ -sitosterol and/or campesterol – stigmasterol being the least soluble. However, when affinity for the aqueous phase is considered, cholesterol still maintains the highest solubility, while for the main PS, campesterol in turn always presents higher solubility than

Abbreviations: BF, bioaccessible fraction; BHT, butylhydroxytoluene; BSA, bovine serum albumin; COPS, cholesterol oxidation products; Fb, fruit beverage; FbM<sub>+</sub>, fruit-based milk beverage with tangerine juice; FbM<sub>-</sub>, fruit-based milk beverage without tangerine juice; GC-FID, gas chromatography-flame ionization detection; GC-MS, gas chromatography mass spectrometer; HMDS, hexamethyldisilazane; IS, internal standard; KOH, potassium hydroxide; LDL, low-density lipoprotein; M, milk beverage; POPs, phytosterol oxidation products; PS, plant sterols; RF, response factor; SIM, selected ion monitoring; SOPS, sterol oxidation products; SPE, solid phase extraction; TMS, trimethylchlorosilane; TMSI, trimethylsilyl ether.

\* Corresponding author. Tel.: +34 963544709; fax: +34 963544894.

E-mail address: [amparoalegria@uv.es](mailto:amparoalegria@uv.es) (A. Alegria).





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Relative expression of cholesterol transport-related proteins and inflammation markers through the induction of 7-ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells

L. Alemany<sup>a</sup>, J.M. Laparra<sup>b</sup>, R. Barberá<sup>a</sup>, A. Alegría<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> *Nutrition and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*<sup>b</sup> *Institute of Agrochemistry and Food Technology, National Research Council, Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 January 2013

Accepted 20 February 2013

Available online 27 February 2013

#### Keywords:

Oxysterols

7-Ketostigmaterol

7-Ketocholesterol

Inflammation

Cholesterol metabolism

### ABSTRACT

Human diets contain sterol oxidation products that can induce cytotoxic effects, mainly caused by cholesterol oxides. However, phytosterol oxides effects have been less extensively investigated. This study evaluates the production of inflammatory biomarkers (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ) and the influence of gene expression transporters and enzymes related to cholesterol absorption and metabolism (NPC1L1, ABCG5/8, HMGCoA, ACAT) produced by 7-ketosterols (stigmaterol/cholesterol) in Caco-2 cells. These effects were linked to intracellular signaling pathways by using several inhibitors. Results showed 7-ketostigmaterol to have a greater proinflammatory potential than 7-ketocholesterol. In non-pre-treated cells, only efflux transporters were down-regulated by 7-ketosterols, showing a greater influence upon ABCG5 expression. Cell-pre-incubation with bradykinin induced changes in ABCG expression levels after 7-ketostigmaterol-incubation; however, the energetic metabolism inhibition reduced NPC1L1 expression only in 7-ketocholesterol-incubated cells. In non-pre-treated cells, HMG-CoA was up-regulated by both 7-ketosterols. However, exposure to inhibitors down-regulated the expression levels, mainly in 7-ketocholesterol-incubated cells. While ACAT expression values in non-pre-treated cells were unchanged, exposure to inhibitors caused down-regulation of mRNA levels. These results suggest that internalization and excretion of 7-ketostigmaterol is probably influenced by [Ca]<sub>i</sub>, which also could mediate HMGCoA activity in POPs metabolism. However, energetic metabolism and reducing equivalents exert different influences upon the 7-ketosterol internalization.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plant sterols (PS) have been used for the enrichment of several foods mainly due to their blood cholesterol-lowering effect, thereby contributing to reduce cardiovascular risk (García-Llata and Rodríguez-Estrada, 2011). Other beneficial properties have also been associated to PS, such as antiinflammatory effects (Othman and Moghadasian, 2011).

Plant sterols can undergo oxidation similarly to cholesterol because of structural similarities in their chemical structures, giving

rise to phytosterol oxidation products (POPs). A previous work by our group has demonstrated that 7-ketostigmaterol did not induce cytotoxic effects in intestinal epithelial (Caco-2) cells, and inhibited 7-ketocholesterol cytotoxicity in cultured intestinal cells when both compounds were present in the culture media (Alemany et al., 2012). These data are in good agreement with the lesser susceptibility to cytotoxic effects caused by POPs in liver (HepG2) cells (Koschutnig et al., 2009) or Caco-2 cells, monocytic (U937) cells and HepG2 cells (Ryan et al., 2005) – suggesting that 7-ketostigmaterol could reduce the intracellular accumulation of 7-ketocholesterol. From the limited data available, it is currently not possible to speculate about which specific mechanism or mechanisms underlie this influence.

At intestinal epithelial level, the Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) transporter facilitates cholesterol transport into the intestinal mucosa (Hui and Howles, 2005; Sudhop et al., 2005), with the suggested additional participation of passive diffusion processes in relation to cholesterol absorption. Intracellular accumulation of cholesterol results from the coordinated action of influx and efflux (ABCG5- and 8-) transporters to the lumen, though esterification (ACAT) processes are also involved,

Abbreviations: ABCG5/8, ATP binding cassette proteins (G5/8); ACAT, acyl-CoA cholesterol acyltransferase; [Ca]<sub>i</sub>, intracellular calcium; COPs, cholesterol oxidation products; DHR, 12,3-dihydrochloramine; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; ER, endoplasmic reticulum; FBS, fetal bovine serum; HMG-CoA reductase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; IL, interleukin; LDL, low-density lipoprotein; LXr, liver X receptor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NPC1L1, Niemann-Pick C1-Like 1; PI, propidium iodide; POPs, phytosterols oxidation products; PS, plant sterols; rt-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ .

\* Corresponding author. Tel.: +34 963544907; fax: +34 3544954.

E-mail address: [amparo.alegría@uv.es](mailto:amparo.alegría@uv.es) (A. Alegría).



## **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS:**

Autores: **Alemany, L.**, González-Larena, M., García-Llatas, G., Alegría, A., Barberá, R., Lagarda, M.J.

Título: Gas chromatographic determination of phytosterols and their oxidation products in enriched fruit beverages.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 28th International Symposium on Chromatography.

Lugar de realización: Valencia, 2010.

Autores: **Alemany, L.**, Laparra, J.M., Alegría, A., Barberá R.

Título: Citotoxicidad de 7-cetoesteroles (stigmasterol y colesterol) en células intestinales.

Tipo de participación: Ponencia.

Congreso: VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Lugar de realización: Valencia, 2011.

Autores: **Alemany, L.**, Laparra, J.M., Alegría, A., Barberá, R.

Título: Interaction of 7keto-stigmasterol and 7k-cholesterol to intestinal (Caco-2) cells.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 11th European Nutrition Conference – FENS.

Lugar de realización: Madrid, 2011.

Autores: **Alemaný, L.**, Laparra, J.M., Alegría, A., Barberá, R.

Título: Changes in the expression of proteins to sterol transport and cholesterol metabolism caused by 7 $\alpha$ -sterols-mediated stress in Caco-2 cells.

Tipo de participación: Ponencia.

Congreso: 1<sup>st</sup> European Network on Oxysterols Research (Oxysterols and Related Sterols in Chemistry, Biology & Medicine) (ENOR).

Lugar de realización: Roma (Italia), 2011.

Autores: **Alemaný, L.**, Laparra, J.M., García-Llatas, G., Rodríguez-Estrada, M.T., Barberá, R., Alegría, A.

Título: Bioaccessibility of plant sterols and their oxides in enriched fruit and/or milk-based beverages.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 1st International Conference on Food Digestion.

Lugar de realización: Cesena (Italia), 2012.

Autores: **Alemaný, L.**, Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría, A.

Título: 7-ketostigmasterol protects against 7-ketocholesterol cytotoxicity but induces inflammation to intestinal epithelial cells.

Tipo de participación: Ponencia.

Congreso: 2<sup>nd</sup> European Network on Oxysterols Research (ENOR).

Lugar de realización: Dijon (France), 2012

Autores: **Alemaný, L.**, Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría A.

Título: Plant sterols stability in enriched fruit-milk beverages.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 10th Eurofed lípids (European Federation for the Science and Technology of Lipids).

Lugar de realización: Krakow (Poland), 2012.

Autores: **Alemaný, L.**, Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría, A.

Título: Cytokines profiles in intestinal epithelial (Caco-2) cells exposed to 7-ketostigmasterol or 7-ketocholesterol.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 6th International Immunonutrition workshop.

Lugar de realización: Palma de Mallorca, 2012.

Autores: **Alemaný, L.**, Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría, A.

Título: Bioaccessibility of cholesterol oxides in plant sterol-enriched beverages.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 2nd International Conference on Food Digestion.

Lugar de realización: Madrid, 2013.

### ***Otros***

Difusión de resultados en medios de comunicación digitales. Resultados del estudio “Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources” en <http://www.nutraingredients.com>

