

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGÍA**

**Efecto del consumo del aceite  
de oliva sobre la composición  
de las lipoproteínas de baja  
densidad en individuos de  
diferentes países europeos.**

**Karina de la Torre Carbot, 2007**

# **V. DISCUSIÓN GENERAL**





## **V. Discusión general**

El aceite de oliva, típico en la dieta mediterránea, ha sido asociado a una reducida incidencia de factores de riesgo en la aparición y desarrollo de enfermedades cardíacas. Esto es explicado en parte a la alta cantidad de AGMI que contiene, pero también por la presencia de compuestos minoritarios que cumplen papeles metabólicos importantes en el organismo <sup>14;142;145-147;161</sup>. El aceite de oliva contiene en su fracción minoritaria, un conjunto de compuestos fenólicos que están relacionados principalmente con la capacidad antioxidante.

La composición de la LDL es un factor clave para el desarrollo de la aterosclerosis dada la capacidad de estas lipoproteínas a oxidarse y formar la placa de ateroma. Así pues, en este trabajo se ha estudiado la composición de la LDL en relación al consumo del aceite de oliva. A continuación se discuten los resultados de los trabajos que fueron realizados para cubrir este objetivo principal.

### **1. Estudio de compuestos fenólicos en aceite de oliva**

Tradicionalmente la fracción fenólica de los aceites se llevaba a cabo por extracción líquida-líquida, con una solución hexánica y una porción polar formada por agua:metanol, seguida de la evaporación de este extracto y reconstitución del mismo. La extracción en fase sólida tiene varias ventajas sobre la extracción líquido-líquido, ya que esta última es más rápida, cómoda, y se reduce la cantidad de muestra y disolventes requeridos.

Se han desarrollado métodos con anterioridad utilizando otro tipos de cartuchos como el C18 y el C8, sin embargo las recuperaciones eran bajas <sup>257</sup>.

El estudio de compuestos contenidos en una matriz compleja como es el extracto polar del aceite de oliva, requiere de un cuidadoso proceso

correctamente diseñado, en el que se tienen que considerar varios factores como son la limpieza de la muestra y recuperación de los compuestos. En este caso, se ha desarrollado un método para determinar los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen. Todas las condiciones sobre el proceso de lavado y elución fueron cuidadosamente diseñadas y optimizadas para mejorar la recuperación de dichos compuestos.

Otro reto es lograr en el sistema de cromatográfico una adecuada separación de los compuestos encontrados en esta matriz tan compleja para su identificación y cuantificación, por lo que la composición de la fase móvil del sistema cromatográfico y el gradiente utilizado deben ser optimizados cuidadosamente para alcanzar una buena resolución entre los compuestos.

La espectrometría de masas ofrece la posibilidad de excluir la presencia de interferencias. Los modos MS como barrido completo (*full scan*) y los modos MS/MS como *product ion scan* fueron utilizados para verificar la información estructural de los compuestos.

En cuanto a los hallazgos encontrados en esta parte de la investigación, se puede mencionar que fueron observados varios compuestos derivados de ligstrósido y oleuropeína con la misma masa-carga ( $m/z$ ). Para identificar las diferencias entre estas estructuras, se utilizó la espectrometría de masas MS/MS.

La mayoría de los estudios, no profundizan sobre la compleja red de isoformas existentes en el aceite. La bibliografía encontrada comprende información incompleta y a menudo contradictoria. Nueve formas básicas de ligstrósido y oleuropeína han sido encontradas en diferentes referencias. Cada modelo comparte el mismo derivado de ácido elenólico y la diferencia entre los diversos aglicones está sujeta a la presencia o ausencia de grupos aldehídos, metilo, carboxilo, y a la forma cerrada o abierta del fragmento elenólico, mientras que la diferencia entre ligstrósido y oleuropeína, que es la misma entre tirosol y hidroxitirosol, se debe a la presencia de uno o dos grupos hidroxilo en el anillo fenólico respectivamente.

Cuando el *product ion scan* fue aplicado a las isoformas presentes, en algunos casos no se encontró diferencia entre los espectros obtenidos, como es el caso de los derivados de oleuropeína con  $m/z$  377 (4 isoformas, con 3 de ellos con espectros similares), el caso del derivado de ligstrósido con  $m/z$  361 (5 isoformas, con 4 de ellos con espectros similares) y el caso del derivado de ligstrósido con  $m/z$  393 (3 isoformas, con 3 de ellos con espectros similares).

En este trabajo se encontró una molécula con  $m/z$  365, su espectro del *product ion scan* muestra la molécula  $m/z$  153 que indica la presencia de hidroxitirosol, por lo que podemos concluir que es un derivado de oleuropeína. De igual manera, se encontró otro compuesto de  $m/z$  553, el cual ha generado un fragmento con  $m/z$  137, por lo que podemos inferir que se trata de un compuesto que comprende tirosol. Sin embargo, para determinar la fórmula química de estos compuestos, es necesario aplicar otro tipo de pruebas como sería la resonancia magnética nuclear, que permitiría elucidar la posición aproximada de sus átomos en su estructura.

Entre los compuestos más abundantes encontrados en estas muestras, además de los secoiridoides derivados de ligstrósido y oleuropeína, están los 2 principales alcoholes fenólicos, el tirosol e hidroxitirosol, estos dos últimos de hecho provenientes de los dos primeros. En las muestras estudiadas, los secoiridoides completaron de un 77 a un 88% del total de los compuestos fenólicos, mientras que si hablamos del porcentaje de compuestos fenólicos derivados de oleuropeína y ligstrósido e incluimos en este grupo el hidroxitirosol y tirosol, entonces estos fenoles comprenden del 87 al 92% del total de fenoles contenidos en las muestras estudiadas.

Los ácidos fenólicos, son otro grupo de compuestos que se encuentra en el aceite de oliva <sup>55</sup>, en este estudio se han encontrado ácido vainílico y ácido *p*-cumárico. Otro compuesto fenólico encontrado fue la vainillina.

Dentro de los flavonoides se identifican y cuantifican en estas muestras luteolina, apigenina y metoxiluteolina, mientras que dos compuesto más no

identificados, se cuantificaron como flavonoides por presentar su máxima absorbancia 320 nm ante el HPLC.

Por último, aunque se determinó la presencia del ácido elenólico y otros autores suelen mencionarlo junto con los compuestos fenólicos no puede ser considerado como tal, ya que sólo corresponde a una parte de la molécula y no contiene en su estructura un anillo fenólico <sup>258</sup>.

Como se ha encontrado en estudios previos, observamos que el aceite de oliva virgen contiene bajas cantidades de ácidos y alcoholes fenólicos y una alta concentración de derivados secoiridoides como aglicones de oleuropeína y ligstrósido, los cuales, son originados de la oleuropeína, dimetil-oleuropeína y glucósidos de ligstrósido encontrados en el fruto <sup>80;82-85</sup>.

Durante el proceso de molienda y batido, se llevan a cabo procesos hidrolíticos que liberan estos compuestos del enlace glucosídico y el aglicón pasa al aceite. El proceso también causa modificaciones parciales a los aglicones de oleuropeína y ligstrósido, los cuales generan isoformas en la estructura elenólica aunque estos compuestos conservan intactos el anillo fenólico <sup>86</sup>. De hecho, algunas de estas isoformas son reversibles para mantener el equilibrio en el sistema <sup>80;86;87;89</sup>.

También en el aceite de oliva almacenado bajo condiciones ácidas, la oleuropeína y el ligstrósido dan lugar, por hidrólisis y liberación del ácido elenólico, a compuestos más polares como son el hidroxitirosol y tirosol. Estos dos compuestos pueden resultar también por hidrólisis enzimática de estos secoiridoides <sup>259</sup>.

El método propuesto, ha mostrado cubrir satisfactoriamente los aspectos de validación: linealidad, recuperación y precisión adecuada y unos límites de detección y cuantificación apropiados, así como ventajas sobre los métodos existentes por lo que ya se ha explicado previamente.

## **2. Estudio de biodisponibilidad, determinación de compuestos fenólicos totales y análisis de los marcadores de oxidación en la fase postprandial**

La oxidación de la LDL *in vivo* no ha sido muy estudiada pero se sabe que puede ser reducida con la presencia de antioxidantes en el plasma. Por esta razón, es más probable que la oxidación de las LDL ocurra en las paredes arteriales cuando sus defensas antioxidantes están mermadas. El paso esencial en el desarrollo de la aterosclerosis empieza cuando la LDL se filtra en la pared arterial y queda atrapada a la espera de una modificación oxidativa. Esta oxidación se producirá dependiendo del balance pro-oxidantes-antioxidantes que presente el medio. Existen diversos mecanismos por los cuales se puede oxidar a la LDL y todos ellos dependen del estado oxidativo de las células de su entorno. Estudios *in vitro* han demostrado que tanto los macrófagos, los monocitos, las células endoteliales como las células del músculo liso de la pared arterial son capaces de oxidarla, ya que estas células liberan especies reactivas al oxígeno cuando su balance de enzimas oxigenasas supera al de antioxidantes 104;120.

En este estudio postprandial fueron utilizados tres tipos similares de aceite de oliva, pero con diferencia en el contenido de compuestos fenólicos. Durante los periodos de blanqueo se utilizó el aceite de oliva refinado con la finalidad de evitar las diferencias en el tipo de fuente de grasa ingerida y permitió la homogeneización de la composición de los ácidos grasos de la LDL al inicio de cada intervención. Con este diseño se evitó la interferencia del ácido graso oleico cuando se estudió la capacidad antioxidante postprandial de los compuestos fenólicos del aceite de oliva.

### **2.1. Aumento de los compuestos fenólicos totales**

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la incubación de plasma con extractos de aceite de oliva virgen permite un incremento de los compuestos fenólicos en LDL <sup>20</sup>, mientras que en este estudio, se reporta un incremento, *in*



*vivo*, en tiempo postprandial, en el cual se ha demostrado que el contenido total de compuestos fenólicos en LDL incrementa en una dosis dependiente con el contenido de compuestos fenólicos administrados, y que los compuestos fenólicos fueron absorbidos y tuvieron un perfil farmaco-cinético dependiente de la concentración de compuestos fenólicos de los diferentes aceite de oliva. De la misma manera, la disminución significativa de compuestos fenólicos observada en LDL después de la ingestión del aceite pobre en compuestos fenólicos, puede deberse a una mayor susceptibilidad a la oxidación de estos compuestos fenólicos previamente unidos y desprovistos de una reforzada protección por los compuestos fenólicos del aceite de oliva ante el estrés oxidativo postprandial.

*In vitro*, ha quedado demostrado que los antioxidantes se protegen unos a otros en los sistemas biológicos <sup>95</sup>. De la misma manera, los compuestos fenólicos provenientes del aceite de oliva, pueden proteger a otros compuestos fenólicos unidos a la LDL del proceso de oxidación. En el caso de este estudio, nuestros resultados sugieren que en relación al aceite de oliva común, con un contenido medio de compuestos fenólicos, y en relación al consumo de aceite de oliva virgen con alto contenido de compuestos fenólicos, el contenido de estos protegió de la degradación a los compuestos fenólicos presentes en la LDL.

La relación directa observada entre los valores encontrados de hidroxitirosol y tirosol en plasma con los cambios en el contenido de compuestos fenólicos en LDL después del consumo del aceite de oliva virgen, sostiene la idea de que el incremento postprandial observado de los compuestos fenólicos, se atribuye a la concentración de compuestos fenólicos consumidos, mientras que el hecho de que los compuestos fenólicos provenientes del aceite de oliva pueden proteger el contenido total de compuestos fenólicos de la LDL, refuerzan su papel como antioxidantes *in vivo*.

## **2.2. Marcadores de estrés oxidativo**

Los compuestos fenólicos del aceite de oliva han mostrado contrarrestar tanto la oxidación dependiente de metales y la oxidación radicalaria de la LDL e impedir la generación de reacciones en cadena por la peroxidación lipídica <sup>235;260</sup>.

En este caso, las diferencias en el grado del estrés oxidativo se reflejaron en los marcadores asociados con la oxidación de la LDL, en relación al tipo de aceite consumido y el incremento dependiente del contenido total de compuestos fenólicos observados después del consumo de aceite de oliva virgen y aceite de oliva común puede ser una explicación directa a este hecho.

En este estudio, el grado del estrés oxidativo postprandial fue menor cuando mayor era el contenido de compuestos fenólicos en el aceite consumido y la LDL oxidada sólo incrementó significativamente después del consumo de aceite de oliva con bajo contenido de compuestos fenólicos. Por otro lado, la ingestión de aceite de oliva virgen previno de un aumento agudo de 3-clorotirosina, marcador específico de la oxidación de la proteína de la LDL, mientras que el mayor incremento de isoprostanos, se observó después del consumo del aceite de oliva refinado y el menor después del consumo de aceite de oliva virgen.

Estos datos sugieren que en el caso del consumo del aceite de oliva virgen y aceite de oliva común el contenido de compuestos fenólicos del aceite de oliva protegió la LDL frente a la degradación de compuestos fenólicos presentes en ésta. Los compuestos fenólicos capaces de unirse en esta partícula, pueden ejercer su actividad secuestradora de radicales libres en la arteria íntima, donde ocurre principalmente la oxidación de la LDL <sup>7</sup>, por lo que el contenido fenólico de un aceite de oliva, puede modular el balance oxidativo/antioxidativo en plasma y en LDL ante una situación de estrés oxidativo como es la etapa postprandial.

Las LDL de los periodos postprandiales, suelen ser más susceptibles a la oxidación, y por lo tanto son más aterogénicas <sup>118</sup>, de ahí que, si el aceite de oliva es capaz de modificar la composición de estas LDL, en periodos postprandiales,

sobre todo en cuanto al contenido de compuestos fenólicos, puede ser un factor protector para prevenir de esta forma el riesgo cardiovascular.

### **3. Presencia de metabolitos de compuestos fenólicos en LDL**

Las LDL son muy ricas en ácido linoleico, el cual es muy susceptible de ser atacado por radicales libres, esto sugiere que, la propia composición de la LDL es un factor importante para determinar la aterogenidad de la partícula. La LDL contiene, presumiblemente en el área de superficie, moléculas de vitamina E y compuestos fenólicos, que la protegen de procesos oxidativos. Si el balance entre los sustratos susceptibles de oxidación en la LDL: los AGPI (tanto en forma de éster de colesterol como de fosfolípidos) o el colesterol no esterificado, y los antioxidantes es desfavorable, los especies reactivas al oxígeno procedentes de las células vecinas podrán oxidarla muy fácilmente.

Sin embargo, el papel de los metabolitos de compuestos fenólicos no ha sido ampliamente estudiado, y las características químicas de los compuestos antioxidantes, incluyendo su solubilidad, habilidad de regeneración, estructura, actividad y biodisponibilidad son factores importantes a considerar.

Durante esta parte de la investigación, se compararon dos métodos de centrifugado para la separación de las LDL estudiadas y se determinó la presencia de compuestos fenólicos del aceite de oliva en estas.

Los compuestos fenólicos son muy lábiles y están expuestos al deterioro cuando son aislados del sistema biológico. Por tanto es importante optimizar el aislamiento de la LDL, por ello, se compararon dos métodos de aislamiento. El método más corto resultó, como era de esperar, ser el que menos afecta a los antioxidantes encontrados en la LDL.

Se procedió a analizar un pool de LDL obtenida del plasma de 7 voluntarias sanas obtenido 60 minutos después de consumir 50 mL de aceite de oliva virgen

en ayunas, esto con la finalidad de obtener LDL enriquecida de compuestos fenólicos. Dichos valores se compararon con valores obtenidos de muestras en ayunas. Durante una primera exploración se buscaron secoiridoides, flavonoides, fenoles simples y posibles metabolitos.

Como hemos mencionado anteriormente, el hidroxitirosol y tirosol están presentes libres o esterificados con el ácido elenólico. Los derivados de oleuropeína y ligstrósido pueden ser hidrolizados y liberar moléculas de hidroxitirosol, tirosol y ácido elenólico en el tracto gastrointestinal<sup>169;189;194</sup>, una vez absorbidos, estos fenoles pueden estar sujetos a tres principales tipos de conjugación: metilación, sulfatación y glucuronidación<sup>97;169;171;199;261</sup>.

Durante esta investigación se estudiaron los metabolitos directamente sin someterlos a hidrólisis, con la finalidad de obtener información sobre el perfil estructural de estos compuestos. El estudio se centró en los metabolitos de hidroxitirosol, tirosol y ácido homovainílico, se encontraron cinco metabolitos de compuestos fenólicos de mayoritario a minoritario el ácido homovainílico sulfato, hidroxitirosol monosulfato, tirosol sulfato, hidroxitirosol monoglucurónido y tirosol glucurónido. Aunque las mayores concentraciones de compuestos fenólicos en referencia al consumo del aceite de oliva en y LDL, se han encontrado en tiempos postprandiales plasma<sup>33;262-265</sup>, existe evidencia de que el hidroxitirosol y tirosol son rápidamente eliminados en orina<sup>193;194</sup>, por lo que el estudio de estos en LDL puede variar de un tiempo a otro para cada compuesto<sup>33</sup>.

Se postula que los compuestos fenólicos están asociados con lipoproteínas por interacciones iónicas con cargas residuales en la superficie de las partículas y se piensa que es probable que esta unión se de por medio de la apoproteína en el caso de la LDL. Es sabida la afinidad entre la albúmina y los compuestos fenólicos, por lo que se conoce que estos compuestos son capaces de unirse a las proteínas. Sin embargo, se sabe también que a pH fisiológico la mayoría de los compuestos fenólicos son capaces de interactuar con la cabeza polar del grupo de fosfolípidos, lo que puede limitar el acceso de oxidantes a través de las

membranas compuestas por éstos, se cree que en este caso la unión está dada por adsorción <sup>171</sup>.

Los compuestos fenólicos del aceite de oliva son capaces de interactuar con diferentes moléculas tanto en ambientes lipófilos e hidrófilos <sup>170;258;266</sup>. El hecho mismo de que estén presentes en aceite de oliva comprueba su afinidad con medios apolares. Se ha demostrado también que los derivados más lipofílicos de los compuestos fenólicos pueden ser capaces de esterificarse con ácidos grasos en el plasma, pero este hecho requiere de mayores estudios <sup>171</sup>.

De cualquier modo, los procesos metabólicos como la glucuronidación o sulfatación pueden afectar el sitio de acción, su capacidad para interactuar con otras moléculas así como la capacidad reductora de estos compuestos <sup>171</sup>, y su actividad sobre la LDL puede quedar no solamente determinada por su actividad biológica en sí sino a la capacidad para unirse a esta partícula <sup>20</sup>.

Por otro lado, la existencia de metabolitos de hidroxitirosol y tirosol (sulfatos), antes del consumo del aceite de oliva puede ser explicada, porque estos compuestos también pueden provenir del metabolismo endógeno de la dopamina y no es extraño encontrar estos compuestos en muestras basales <sup>169;170;180;186;265;267-269</sup>.

El consumo de aceite de oliva puede modificar la composición de la LDL, afectando a la concentración de compuestos minoritarios, lo que puede tener un impacto biológico significativo durante la fase postprandial. La presencia de estos metabolitos en la LDL, demuestra que estos compuestos pueden ejercer su actividad antioxidante en esta partícula, sin embargo, estos metabolitos necesitan ser estudiados con mayor profundidad, ya que la capacidad antioxidante del hidroxitirosol, tirosol y ácido homovainílico sulfatos y/o glucurónidos, así como otros papeles protectores no han sido estudiados ampliamente <sup>199</sup>.

Posteriormente a esta parte de la investigación, se desarrolló un método rápido para la determinación de estos cinco metabolitos.

El estudio de compuestos contenidos en una matriz, requiere de un cuidadoso proceso meticulosamente diseñado, en el que se tienen que cuidar varios factores: limpieza de la muestra y recuperación de los compuestos, por lo que cada una de las condiciones sobre el proceso de lavado y elución fueron cuidadosamente diseñadas para mejorar la recuperación de los compuestos utilizando exclusivamente la cantidad de disolventes necesaria.

Fueron llevados a cabo varios experimentos preliminares para lograr dichos resultados, minimizar costos y gastos de reactivos y conseguir una muestra final lo suficientemente limpia para introducirla en el sensible sistema HPLC-MS/MS. Adaptar el gradiente de elución fue otra tarea necesaria, ya que esta vez se utilizó una columna distinta de 5 cm para agilizar el proceso del sistema cromatográfico. El gradiente y la solución que reconstituye el extracto evaporado, influye marcadamente en la separación y por lo tanto en la detección analítica de los compuestos.

Para acortar aún más el tiempo de elución en el sistema cromatográfico, también se llevaron a cabo pruebas con la velocidad del flujo. Por último, el tiempo final de análisis en el método propuesto es de 7 minutos. La optimización del tiempo representa una gran ventaja en el análisis de un número elevado de muestras.

Las pruebas de validación han demostrado que el método cubre satisfactoriamente los aspectos de validación: linealidad, recuperación, precisión y sensibilidad, por lo que puede ser utilizado en análisis de rutina.

En cuanto a la cuantificación, aunque es siempre preferible usar el propio analito como patrón para cuantificar apropiadamente, esto no es posible siempre. En este caso, se ha cuantificado con compuestos “padres”, considerando que las respuestas de estos con los respectivos metabolitos, es parecida por la similitud en la estructura química. Sin embargo, cabe reconocer que la carencia de patrones de los metabolitos estudiados, incrementa el riesgo de cometer inexactitudes sistemáticas.

Los metabolitos que han podido ser determinados en LDL podrían ser útiles biomarcadores y relacionarlos con marcadores de estrés oxidativo en futuros estudios.

#### **4. Cambios en la composición de la LDL después de un consumo sostenido de aceite de oliva. Ensayo clínico**

La aterogenidad de las LDL está modulada por los niveles de estas en plasma, la afinidad a los componentes de la íntima, tamaño y su composición. Las LDL son muy ricas en ácido linoleico un AGPI muy susceptible de ser atacado por radicales libres. Dietas ricas en ácido graso oleico generan partículas de LDL que aparentemente son más resistentes a la oxidación<sup>11;130;136</sup>. Sin embargo, aparte del perfil de ácidos grasos, la formación de LDL oxidada depende de la presencia y concentración de antioxidantes como la vitamina E y compuestos fenólicos <sup>9;10;20;252</sup>.

##### **4.1. Cambios en la composición de compuestos fenólicos**

Aunque todo aceite de oliva puede proteger a la LDL de la oxidación, el aceite de oliva virgen muestra un incremento en la capacidad antioxidante por su alto contenido en compuestos fenólicos, ya que se ha demostrado que pueden proteger otros compuestos fenólicos unidos a la LDL en frente al proceso de oxidación <sup>10;20;252</sup>.

En esta parte del estudio se investigan los cambios en los metabolitos de compuestos fenólicos anteriormente descritos después de un consumo prolongado de 25 mL por día durante tres semanas de dos tipos de aceite de oliva: aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen. Participaron 40 voluntarios varones sanos provenientes de 6 centros distintos de Dinamarca, Finlandia, Alemania (dos centros), Italia y España. En este caso, se trata de un estudio a medio plazo en el cual se utilizaron dos tipos de aceite de oliva de similar composición pero con diferente concentración de compuestos fenólicos,

cada participante consumió los dos tipos de aceite y cada intervención fue separada por un periodo de blanqueo de dos semanas, en las que se omitió todo consumo de alimentos ricos en antioxidantes y cualquier tipo de aceite de oliva. Las muestras de sangre fueron obtenidas antes y después de cada intervención en ayunas.

Se analizó la concentración de los metabolitos de compuestos fenólicos anteriormente identificados. Los compuestos glucurónidos determinados a tiempo postprandial no fueron detectados en este ensayo probablemente porque las muestras fueron obtenidas en ayunas, en el caso anterior, los compuestos glucurónidos han sido encontrados exclusivamente después de 60 minutos del consumo del aceite de oliva virgen. De la misma manera y bajo la misma explicación, comparando las concentraciones encontradas de los tres metabolitos encontrados, en relación con las cantidades encontradas en el estudio anterior a los 60 minutos de haber consumido el aceite de oliva, observamos que son mucho más bajos estos valores. Mientras que las cantidades a los 60 minutos, fueron de 34.22, 17.23 y 34.22 ng/mg apo B respectivamente para hidroxitirosol, tirosol y ácido homovainílico sulfato, los valores en este estudio fueron muy inferiores. Estos resultados reivindican que los compuestos fenólicos son eliminados rápidamente, por lo que, en estudios donde las muestras son obtenidas algunos minutos después del consumo del aceite de oliva puede ser apreciado un incremento marcado de estos metabolitos. Sin embargo, un requisito para estudiar la relevancia que tienen estos compuestos *in vivo* es determinar su presencia y evolución cinética en el tiempo, estudiar sobre su disponibilidad en LDL, siguiendo la cinética después de ambas: tanto aguda como ingestión sostenida de aceite de oliva para determinar su posible permanencia.

En este estudio, se observa que los metabolitos encontrados tienen una tendencia a aumentar después del consumo de ambos tipos de aceite de oliva. Sin embargo, en el caso del aceite de oliva virgen el incremento es mayor. Mientras no se encuentran diferencias significativas al comparar los valores de antes y después del consumo de aceite de oliva refinado, hay una diferencia



significativa entre antes y después del aceite de oliva virgen en el caso de ácido homovainílico sulfato, hidroxitirosol sulfato y la suma de los tres fenoles.

En el caso del tirosol no hay diferencia significativa aunque se observa una tendencia a aumentar, sin embargo cuando es dividida la muestra por grupos, según su procedencia, en uno de ellos se observa que en el caso del consumo del aceite de oliva refinado existe una disminución significativa de este compuesto y esto puede ser explicado por el gasto de este compuesto ante el estrés oxidativo normalmente generado.

Cuando el porcentaje de cambio es estudiado, hay una diferencia significativa comparando estos valores antes y después del consumo del aceite de oliva refinado *versus* los valores del aceite de oliva virgen en el caso de los tres metabolitos encontrados.

El aceite de oliva provee mayores ventajas sobre otros aceites vegetales ricos en AGMI por el contenido de compuestos fenólicos que presenta. Estos compuestos pueden tener un perfil cinético específico, el cual ha mostrado ser dependiente de la dosis del contenido de compuestos fenólicos en el aceite administrado después de un consumo sostenido de tres semanas. Este incremento sugiere que estos compuestos pueden actuar como antioxidantes y que ellos pueden tener una acción importante en la LDL.

Aunque el aceite de oliva refinado presenta una tendencia a incrementar los valores de estos metabolitos, puede ser explicado por que el consumo de cualquier aceite de oliva enriquece a la LDL de AGMI, los cuales son menos susceptibles a oxidación, por lo que esto reduce el consumo de antioxidantes en la partícula y puede ayudar a preservar los compuestos fenólicos de antemano presentes. Sin embargo, el aceite de oliva virgen incrementa en una manera significativa la concentración de estos metabolitos.

Los compuestos fenólicos que son capaces de unirse a la LDL son buenos candidatos para la prevención efectiva de la peroxidación lipídica y el proceso aterosclerótico. En un futuro, la presencia y concentración de estos compuestos

podrían tener un valor potencial como marcadores para la prevención de la aterosclerosis y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

#### **4.2. Estudio sobre el cambio en la concentración de ácidos grasos**

El tipo de grasa ingerida es un factor determinante para la oxidación de la LDL y otros factores determinantes del riesgo cardiovascular. Se ha visto que dietas ricas en ácido graso oleico ocasionan menos estrés oxidativo que las dietas ricas en ácido graso linoleico <sup>9-11;26;27;130;250</sup>.

En esta parte del estudio también es utilizado un consumo prolongado de 25 mL por día de tres tipos de aceite de oliva: aceite de oliva refinado, aceite de oliva común y aceite de oliva virgen durante tres semanas separadas por periodos de blanqueo. En la investigación participaron 200 voluntarios varones sanos provenientes de 6 centros distintos: Dinamarca, Finlandia, Alemania (2 centros), Italia y España.

Este consumo sostenido de aceite de oliva, en sustitución de otra clase de grasas consumidas a una dosis habitualmente ingerida en la vida cotidiana (25 mL), incrementó las concentraciones de ácido graso oleico de la LDL así como los ratios MUFA/PUFA y oleico/linoleico en la partícula, mientras que estos cambios fueron inversamente relacionados con el daño oxidativo lipídico y la concentración de isoprostanos en plasma, a la vez que se observó un aumento en los valores de HDL en plasma.

Aunque en este estudio se determinan exclusivamente marcadores de estrés oxidativo, en otros estudios el incremento del ratio oleico/linoleico en LDL a mostrado promover favorablemente los cambios en marcadores sobre adhesión de monocitos en endotelio <sup>155</sup>, por lo que el aumento de ácido graso oleico en LDL mejora otras condiciones favorables a parte de las oxidativas.

Los resultados de estos estudios, van de acuerdo a otros estudios realizados en los cuales se ha relacionado el contenido de compuestos fenólicos y AGMI del

aceite de oliva en relación con la modulación del balance oxidativo/antioxidativo en plasma y en LDL ante una situación de estrés oxidativo <sup>9;12;15;17;18;25;28;110;111;113;114;204;270-272</sup>, por lo que estos resultados sostienen que la ingestión diaria y moderada de aceite de oliva puede proteger a la LDL de la oxidación.

Las diferencias significativas observadas muestran como la composición de compuestos fenólicos y AGMI puede estar determinada por los compuestos fenólicos incluidos en la dieta de una manera moderada pero sostenida a mediano plazo, por lo que la dieta afecta dos importantes determinantes de la susceptibilidad a la oxidación de la LDL el contenido de antioxidantes en esta partícula y la composición de ácidos grasos en ella. Esto puede tener un impacto biológico significativo durante la fase postprandial y a largo plazo.

Aunque se ha limitado, en esta sección a hablar casi exclusivamente de los aspectos antioxidante de estos compuestos en la LDL, cabe recalcar aquí que se ha demostrado que tanto los AGMI como los compuestos fenólicos, también proveen otros efectos cardiovasculares protectores por estar implicados en otras acciones metabólicas <sup>9;12;14;19;25;113;120;161;174</sup>.

Es importante también considerar que la disminución del riesgo cardiovascular es modulada por una serie de factores, y no puede quedar reducido al manejo de uno sólo de ellos. Respecto a la dieta, no se puede restar importancia a otros compuestos contenidos en otras fuentes, como son ciertos nutrientes provenientes de frutas y vegetales. Dichos compuestos pueden actuar independientemente o en combinación sinérgica por medio de una gran variedad de mecanismos. De ahí, la importancia de manejar no solo un factor, sino un conjunto de factores que involucren entre ellos un estilo de vida higiénico y saludable.