

REVISIÓN

Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos.

Por F. Guardiola, R. Codony, M. Rafecas y J. Boatella

Unidad de Nutrición y Bromatología, Departamento de Ciencias Fisiológicas Humanas y de la Nutrición.
Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Av. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona.

RESUMEN

Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos.

Este trabajo constituye una revisión bibliográfica en donde se recogen los mecanismos de formación de los diferentes oxisteroles, los factores que influyen en la formación de estos compuestos en alimentos y su contenido en los mismos. Aspectos de creciente interés debido a la gran cantidad de efectos biológicos descritos para estos derivados.

PALABRAS-CLAVE: Alimento — Colesterol — Formación — Oxidación — Oxisterol — Revisión (artículo).

SUMMARY

Oxysterol formation in foods.

This review focuses on the mechanisms of formation of oxysterols and factors that influence on their formation and content in foods. Aspects of growing interest because of the numerous biological effects reported for these compounds.

KEY-WORDS: Cholesterol — Food — Formation — Oxidation — Oxysterol — Review (paper).

1. INTRODUCCION.

La presencia de derivados oxidados del colesterol (oxisteroles) en alimentos se conoce desde los años 60 (Acker y Greve 1963). Un poco más tarde, a finales de esta misma década, se describieron los primeros efectos biológicos para estos compuestos. Así, Bischoff en 1969 demostró que el colesterol-5 α , 6 α -epóxido, administrado subcutáneamente en ratas y ratones, inducía la formación de tumores. Unos años más tarde, se comprobó la capacidad de ciertos oxisteroles para inhibir la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa y de esta manera la síntesis del colesterol (Brown y Goldstein, 1974; Chen et al., 1974; Kandutsch y Chen, 1973). Igualmente, parece comprobado su efecto sobre la presencia de colesterol en lesiones ateromatosas (Gilbert et al., 1972; Smith y Van Lier, 1970; Van Lier y Smith, 1967). Actualmente, se han descrito para estos compuestos otros efectos biológicos, en algunos casos de tipo contradictorio, y que usualmente están en relación con la estructura química del oxisterol considerado. Así, entre estos efectos cabe citar: carcinogénesis y actividad antitumoral; aterogénesis e inhibición de la síntesis de colesterol; efectos sobre la

membrana celular, mutagénesis y citotoxicidad *in vivo* e *in vitro* (Gibbons, 1983; Peng et al., 1991; y Smith y Johnson, 1989). Todos estos resultados indican que son necesarios más conocimientos sobre la naturaleza y los mecanismos concretos relacionados con dichos efectos, lo que constituye un campo de investigación de gran importancia, tanto a nivel fisiológico como nutricional.

2. OXIDACION DEL COLESTEROL.

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

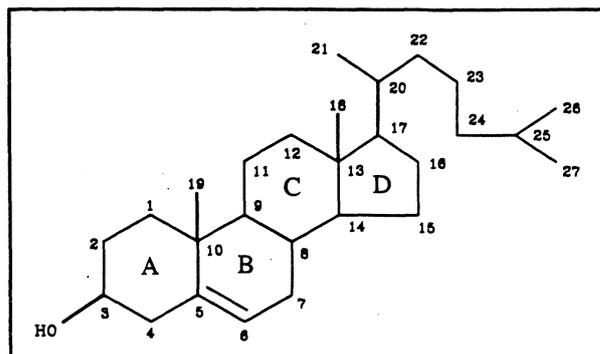


Figura 1
Molécula del colesterol (colest-5-en-3 β -ol).

2.1. Oxidación enzimática

La oxidación enzimática del colesterol tiene lugar básicamente en el hígado y en los tejidos generadores de hormonas esteroideas. A nivel hepático, se forman una serie de compuestos implicados en la biosíntesis de ácidos biliares (7 α -HC, 25-HC, (25R)-26-HC y (25S)-26-HC); mientras que en los tejidos esteroideogénicos se forman compuestos que son intermediarios metabólicos en la biosíntesis de

hormonas esteroideas (22R-HC, (20R,22R)-colest-5-en-3 β ,20,22-triol) (Craates de Paulet et al., 1988; Florez et al., 1987; Harper et al., 1980; Herrera, 1986; Rawn, 1989; Smith, 1990, 1991). Por otro lado, en el cerebro se forma el cerebrosterol (24S-HC), cuyas funciones fisiológicas no están bien establecidas. Referente al tema, también cabe destacar el estudio de Watabe et al. (1980) en el que se demostró que en los microsomas hepáticos bovinos, en presencia de NADPH, FeSO₄ y ADP, el colesterol era transformado en α -CE, β -CE y CT, siendo la relación entre

estos compuestos 1.0:4.3:0.7. En este estudio se observó que el citocromo P-450, que está profundamente implicado en la formación de OE en el cuerpo humano, no lo estaba en la formación de los epóxidos del colesterol. Asimismo, se constató que los CEs eran transformados en CT gracias a la acción de la epoxicolesterol hidrolasa. Este hecho se comprobó con la utilización de inhibidores de esta enzima (5,6 α -imino-5 α -colest-3 β -ol). La formación, *in vitro*, del CT ya había sido observada, en 1962 por Danielsson y Horing, en eritrocitos humanos.

Tabla I
Abreviatura y nomenclatura de los diferentes oxisteroles citados en este trabajo.

| Abreviatura | Nombre vulgar | Nombre sistemático |
|----------------|--|---|
| 7-CC | 7-Cetocolesterol | 3 β -Hidroxicolest-5-en-7-ona |
| 6-CCL | 6-Cetocolestanol | 3 β -Hidroxi-5 α -colest-6-ona |
| 7-CCL | 7-Cetocolestanol | 3 β -Hidroxi-5 α -colest-7-ona |
| CEs | colesterol-5,6-epóxidos (α y β) | |
| α -CE | Colesterol-5 α ,6 α -epóxido | 5,6 α -Epoxi-5 α -colest-3 β -ol |
| β -CE | Colesterol-5 β ,6 β -epóxido | 5,6 β -Epoxi-5 β -colest-3 β -ol |
| CT | Colestantriol | 5 α -Colest-3 β ,5,6 β -triol |
| 4 β -HC | 4 β -Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,4 β -diol |
| 7 α -HC | 7 α -Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,7 α -diol |
| 7 β -HC | 7 β -Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,7 β -diol |
| 20-HC | 20-Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,20-diol |
| 22R-HC | (22R)-22-Hidroxicolesterol | (22R)-Colest-5-en-3 β ,22-diol |
| 24-HC | 24-Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,24-diol |
| 24S-HC | (24S)-24-Hidroxicolesterol | (24S)-Colest-5-en-3 β ,24-diol |
| 25-HC | 25-Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,25-diol |
| (25R)-26-HC | (25R)-26-Hidroxicolesterol | (25R)-Colest-5-en-3 β ,26-diol |
| (25S)-26-HC | (25S)-26-Hidroxicolesterol | (25S)-Colest-5-en-3 β ,26-diol |
| 26-HC | 26-Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,26-diol |
| 27-HC | 27-Hidroxicolesterol | Colest-5-en-3 β ,27-diol |
| 7 α -HS | 7 α -Hidroxisitosterol | Estigmast-5-en-3 β ,7 α -diol |
| 7 β -HS | 7 β -Hidroxisitosterol | Estigmast-5-en-3 β ,7 β -diol |
| α -SE | Sitosterol-5 α ,6 α -epóxido | 5,6 α -Epoxi-5 α -estigmast-3 β -ol |
| β -SE | Sitosterol-5 β ,6 β -epóxido | 5,6 β -Epoxi-5 β -estigmast-3 β -ol |

Por otro lado, actualmente, se está ensayando la fermentación bacteriana como método para la reducción de la cantidad de colesterol en ovoproductos. En relación con este punto, Przybylski et al. (1993) estudiaron la transformación de la molécula de colesterol al ser fermentado con *Bacillus coagulans* B1, una de las cepas utilizadas para eliminar el colesterol del huevo. En este estudio, se observó que el colesterol, durante la fermentación, fue oxidado hasta un 35%, identificándose los siguientes OE: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC y 20-HC.

2.2. Oxidación no enzimática.

La oxidación no enzimática del colesterol se conoce desde principios de siglo, cuando Schulze y Winterstein (1904) observaron que esta sustancia en su forma cristalina

experimentaba una transformación, como consecuencia de su exposición a radiaciones solares. Posteriormente, Bergström y Wintersteiner (1941, 1942 a, 1942 b) comprobaron la naturaleza oxidativa del fenómeno, pero hicieron falta aún varios años para conocer los mecanismos de este proceso. Los estudios de oxidación no enzimática del colesterol se realizan en modelos experimentales donde el colesterol se encuentra en su forma cristalina, en solución o dispersión acuosa. Estos dos últimos modelos son los más válidos, ya que el colesterol en alimentos y seres vivos se encuentra en un entorno acuoso. Uno de los trabajos más importantes es el de Smith et al. (1967), en el cual se aplicó la cromatografía en capa fina para determinar los productos de oxidación del colesterol bajo diferentes condiciones, entre las cuales figuran: a) oxidación del colesterol en dispersiones coloidales a diferentes tempe-

raturas y con diferentes iones de metales de transición como catalizadores; b) oxidación del colesterol en presencia de aire a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo; c) oxidación del colesterol calentado a 65 °C en presencia de aire durante diferentes periodos de tiempo; y d) oxidación del colesterol al ser irradiado con luz UV (254 nm).

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

En principio, el radical peroxilo que se forma con mayor facilidad es el correspondiente al carbono número 7. No obstante, por reacciones de transferencia de radicales se pueden formar otros radicales peroxilo y sus correspondientes hidroperóxidos, tales como los que se forman en la cadena lateral, que dan lugar a una serie de derivados hidroxilados del colesterol (20-HC, 24-HC, 25-HC, 26-HC y 27-HC). De estos derivados destacan los que se forman sobre los carbonos terciarios (25-HC y 20-HC) (figura 2).

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

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

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

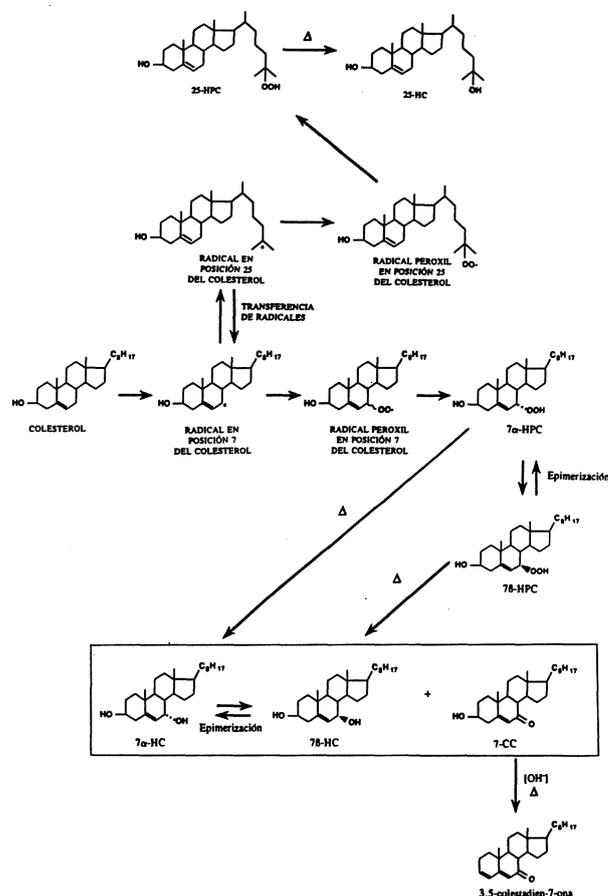


Figura 2
Autooxidación del colesterol. Formación de los derivados oxidados sobre el anillo B y la cadena lateral (Smith, 1990).

La oxidación fotoquímica es otro de los mecanismos no enzimáticos de oxidación del colesterol. La exposición a la luz y al aire del colesterol sólo comporta la autooxidación, ya descrita anteriormente. En este caso, el colesterol es oxidado por el oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$), especie generada fotoquímicamente a partir de oxígeno molecular triplete ($^3\text{O}_2$) (Bhagavan y Nair, 1992). De esta manera se forman hidroperóxidos, entre los que destaca el 3 β -hidroxi-5 α -colest-6-en-5-hidroperóxido. Por descomposición térmica de este hidroperóxido se forman colest-4,6-dien-3-ona y 5 α -colest-6-en-3 β ,5-diol. El 5 α -hidroperóxido por transposición estereoespecífica da lugar al 3 β -hidroxi-7 α -colest-5-en-7-hidroperóxido, que se descompone dando lugar a 7 α -HC y 7-CC. En este proceso también se forma en una menor proporción el 3 β -hidroxicolest-4-en-6-hidroperóxido y sus productos de descomposición térmica (colest-4-en-3 β ,6-dioles y 3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona).

Además de estos tres mecanismos, el colesterol puede ser oxidado no enzimáticamente por una serie de oxidan-

tes como son las especies triatómicas (O_3) y otras diatómicas (O_2^+) del oxígeno, los óxidos de nitrógeno (NO y NO_2), el CCl_4 , etc (Smith, 1981). También se puede citar que las radiaciones gamma provocan la oxidación del colesterol en su anillo A (Maerker y Jones, 1992; Hwang y Maerker, 1993a y b).

2.3. Actividad antioxidante *in vivo* del colesterol.

Los procesos de oxidación enzimática del colesterol en el organismo humano fueron los que inicialmente se pusieron de manifiesto, pero, recientemente, se ha evidenciado que también se produce la oxidación no enzimática (Smith, 1990, 1991). Además, según estos autores el colesterol actuaría, *in vivo*, como un antioxidante plasmático que reaccionaría con los oxidantes endógenos dando lugar a los OE. A favor de esta hipótesis se encuentra la comprobada actividad antioxidante del colesterol *in vitro*, ya sea interceptando oxidantes biológicos (Gumulka et al., 1982; Smith, 1990; Smith y Jaworski, 1988; Smith et al., 1978; Smith y Stroud, 1978; Smith y Teng, 1974; Teng y Smith, 1973, 1976) o protegiendo de la oxidación a liposomas (Gutteridge, 1978; Sevanian y McLeod, 1987; Szebeni y Toth, 1986) o a eritrocitos (Clemens et al., 1987; Jain y Shohet, 1981). En relación con este tema, Blackwelder y Pike (1990) comprobaron, al separar los TG y los FL de la fracción grasa del huevo, que estos compuestos se oxidaban con mayor facilidad que la fracción grasa completa, lo cual parece indicar la acción antioxidante del colesterol en este sustrato.

Esta hipótesis está relacionada con el hecho, comprobado epidemiológicamente (Duthie, 1991; Fitch, 1994), que la mortalidad por enfermedades cardiovasculares guarda una relación inversa con el "índice de actividad antioxidante acumulativa", que en 1986 Gey definió como:

$$\frac{[\text{Vitamina E}] [\text{Vitamina C}] [\beta\text{-Caroteno}] [\text{Selenio}]}{[\text{Colesterol}]}$$

Todas las concentraciones de este índice son plasmáticas. El diseño de este índice parece indicar que una dieta pobre en antioxidantes naturales llevaría a que el colesterol tuviera que actuar como antioxidante sustituto dando lugar a sus correspondientes derivados oxidados, que según diferentes autores, han demostrado ser un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Hubbard et al. 1989; Peng et al., 1991; Smith y Johnson, 1989). Asimismo, en diversos estudios epidemiológicos se ha observado que dietas ricas en vitamina E pueden prevenir la aparición de diversas patologías, como las enfermedades cardiovasculares, determinados tipos de cáncer y las cataratas (Comstock et al., 1991; Gey et al., 1987, 1991; Knekt et al., 1991; Robertson et al., 1991), e incluso paliar los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Fitch, 1994). Además, en un estudio realizado por Kok et al. (1991) se observó que una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), pero pobre en antioxidantes naturales, era un factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis. Esto está relacionado con el hecho que la

ingestión de las altas cantidades de AGPI, no suficientemente protegidas por antioxidantes biológicos, se ha correlacionado con la oxidación de las LDL y, en consecuencia, con el papel de estas lipoproteínas oxidadas en el desarrollo del proceso aterosclerótico (Duthie, 1991; Esterbauer et al., 1991; Luc y Fruchart, 1991). Trabajos recientes (Bernheimer et al., 1987; Boissoneault et al., 1991; Peng et al., 1982) atribuyen este efecto a la presencia de colesterol oxidado en estas lipoproteínas. Estas lipoproteínas-OE parecen poseer un papel relevante en diferentes fases del proceso aterosclerótico, relacionándose de forma clara con la alteración de la permeabilidad del endotelio y con la formación de células espumosas. La actividad antioxidante *in vivo* de la vitamina E se conoce desde hace años, pero estudios recientes han permitido establecer que otros compuestos, tales como la vitamina C, los carotenoides, el selenio y, más recientemente, los polifenoles y el propio colesterol, también presentan este efecto (Frankel et al., 1993; Renaud y De Logeril, 1992). La vitamina C también se ha asociado con la prevención de las cataratas, determinados tipos de cáncer y las enfermedades cardiovasculares, mientras que el β -caroteno sólo con la del cáncer (Fitch, 1994; Robertson et al., 1991).

Esta hipótesis, según la cual los OE presentes en sangre serían productos de oxidación del colesterol *in vivo*, se complementa con el hecho últimamente demostrado que la ingestión de alimentos ricos en OE implica un aumento de los niveles plasmáticos de estos compuestos (Emanuel et al. 1991). Así, la presencia de los OE en sangre puede obedecer a ambos orígenes, que son perfectamente compatibles, e incluso se ha postulado un tercero, que consistiría en una formación de estos compuestos por mecanismos enzimáticos todavía no del todo establecidos. Por otro lado, se ha comprobado que los OE se absorben a nivel intestinal en animales de experimentación (Bascoul et al. 1986 a; Fornas et al., 1984), y asimismo se ha observado que en el plasma humano los quilomicrones (Addis et al., 1989) y las lipoproteínas (Addis et al. 1989, Peng et al. 1982) se encuentran asociados a OE. Así pues, relacionando estos estudios con el de Emanuel et al. (1991) se puede pensar que en el ser humano los OE muy probablemente se absorberían a nivel intestinal, se incorporarían a quilomicrones y entrarían en la circulación sistémica unidos a lipoproteínas.

3. FORMACIÓN DE OXIESTEROLES EN ALIMENTOS.

El estudio de los factores que influyen en la formación de OE, así como la determinación de su contenido en alimentos, posee especial importancia debido a los efectos biológicos de estos compuestos y a que, tal como demostraron Emanuel et al. (1991), los OE de los alimentos son absorbidos por el organismo humano.

Los factores que influyen en la formación de oxiesteroles en productos alimenticios son múltiples, pero según Sander et al. (1989), los más importantes, además de la presencia de oxígeno y del valor de actividad del agua (a_w), son: temperatura, radiaciones, agentes fotosensibilizantes, iones de metales de transición, tiempo de almacenamien-

to, pH y concentración de colesterol que presenta el alimento.

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

Por último, cabe citar algunos trabajos que estudian la formación de OE en sebos (Bascoul et al., 1985; Park y

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

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

Tabla II
Productos alimenticios en los que ha sido detectada la presencia de oxiesteroles.

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

Las especies de OE más frecuentemente detectadas en productos alimenticios son las siguientes: α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, CT y 7-CC. Como norma general, de estos siete OE el que se presenta en concentraciones más elevadas es el 7-CC y el que lo hace a niveles más

bajos es el 25-HC. Si bien, es importante destacar que la heterogeneidad en la metodología analítica y en el planteamiento de los estudios conducen a una cierta variabilidad de los resultados, que se observa en los diferentes estudios publicados. La tabla III presenta los niveles máximos y

mínimos de OE detectados en diferentes productos alimenticios. También se ha observado que en las pautas de formación de OE se pueden distinguir tres grupos diferenciados (Pie et al., 1991; Zhang y Addis, 1990):

- OE con una función oxigenada sobre el carbono nº 7;
- OE con función oxigenada en la cadena lateral;
- Epóxidos de colesterol y CT.

También deben tomarse en consideración los derivados oxidados de los distintos fitosteroles, los cuales han sido poco estudiados. A este respecto, Yanishlieva-Maslarova y Marinova (1985) mencionan productos de oxidación del sitosterol, tales como: α -SE, β -SE, 7α -HS, 7β -HS, 5α -estigmastan- $3\beta,5,6\beta$ -triol, 3β -hidroxi-estigmast-5-en-7-ona, estigmastan-3,5-dien-7-ona, etc, formados en diversos

Tabla III
Niveles máximos y mínimos de OE detectados en diferentes productos alimenticios
(la bibliografía es la de la tabla II).

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

^a No detectado. ^b No determinado. ^c Trazas.

modelos experimentales. Por otro lado, en patatas fritas, Lee et al. (1985) detectaron derivados oxidados del sitosterol (7α -HS, 7β -HS y β -SE).

3.1. Acción de las radiaciones.

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

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

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

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

Las radiaciones gamma han sido utilizadas en algunos países para la conservación de carnes por su poder bactericida. Estas radiaciones poseen un notable poder oxidante y, debido a ello, son objeto de diferentes estudios en donde se evalúa su capacidad para generar derivados oxidados del colesterol en carnes. Maerker y Jones (1992) estudiaron como afectaba la irradiación con rayos gamma sobre las suspensiones acuosas de colesterol y de OE. En este estudio se observó que a partir del colesterol se formaron los siguientes compuestos: α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC, 7-CC, 6-CCL y 7-CCL. En el mismo estudio también se observó que bajo la influencia de las radiaciones gamma el β -CE y, en menor grado, el α -CE dieron como producto el 6-CCL y, de igual forma, el 7α -HC, el 7β -HC y el 7-

CC, dieron el 7-CCL. Estas observaciones hacen pensar en el 6-CCL y el 7-CCL como marcadores para saber si las carnes han sido irradiadas. Más tarde Hwang y Maerker (1993 a) estudiaron como influía la irradiación con rayos gamma sobre carnes de cerdo, buey y ternera. Estos autores observaron que las radiaciones gamma implicaban un aumento de la concentración de OE en estas carnes, que aumentaba con el tiempo de conservación de las mismas. Posteriormente, estos mismos autores (1993 b) estudiaron la formación de 6-CCL en carnes de buey, cordero, ternera y pollo, sometidas y no a radiaciones gamma. En el caso de la carne de pollo no irradiada este compuesto no fue detectado, pero si lo fue, y a niveles apreciables, en la carne de pollo irradiada. Según esta observación este derivado podría ser un buen marcador para saber si la carne de pollo ha sido o no irradiada. En otro tipo de carnes el compuesto se detectó tanto si la carne había sido irradiada como si no, aunque en mayor proporción en la irradiada.

3.2. Tiempo y condiciones de almacenamiento.

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

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

Por otro lado, la conservación de los productos lácteos también ha sido ampliamente estudiada. Sander et al. (1988) observaron la formación de OE durante el almacenamiento de mantequilla a diferentes temperaturas de conservación (-26°C, 4°C y 16°C), sustancialmente durante la primera semana. Al mismo tiempo, no se observaron diferencias significativas, en la formación de OE, entre estas tres temperaturas. También Sander, en compañía de otros autores (1989), observó que el almacenamiento durante 6 meses de quesos en polvo a 4, 21 y 38°C no implicaba un aumento en el contenido de OE. Nourooz-

Zadeh y Appelqvist (1988 b) determinaron el contenido de OE en leches desnatadas en polvo y detectaron un cierto aumento de los OE en función del tiempo de almacenaje. Estos mismos autores observaron el mismo efecto en mantequilla conservada a 4°C, durante unos 4 meses. En este mismo alimento, Pie et al. (1990) comprobaron la formación de OE durante el almacenamiento de este producto a - 20°C a lo largo de seis meses. Finocchiaro et al. (1984), en un estudio de conservación de aceites de mantequilla clarificados, observaron que el hecho de envasarlos en atmósfera inerte prevenía la formación de OE.

Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1987) realizaron un estudio de almacenamiento de ovoproductos en polvo, donde se observó que durante los dos primeros meses a 4°C no se formaban cantidades apreciables de OE, aunque sí se formaban a tiempos superiores. En este mismo estudio se comprobó que la formación de OE en yema de huevo en polvo puede reducirse a bajas temperaturas de almacenamiento.

3.3. Prevención de la autooxidación: adición de sal y antioxidantes.

Como es sabido, la oxidación lipídica en los alimentos es un proceso dependiente, entre otros, del factor actividad del agua (a_w) (Karel, 1980).

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

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

3.4. Tratamientos tecnológicos.

Algunos tratamientos tecnológicos pueden dar lugar a la formación de OE, especialmente aquellos en los que se aplica un tratamiento térmico.

Se ha comprobado que el sistema de secado empleado en la obtención de productos deshidratados puede incidir en la formación de OE. En este sentido, el sistema más ventajoso para prevenir la formación de estos compuestos es la liofilización, pues, se ha observado que en ovoproductos recién elaborados, desecados por este sistema, no se detectan OE (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987; Tsai y Hudson, 1984), al contrario de lo que se produce al obtener estos productos por atomización.

En estudios realizados sobre la influencia del sistema de atomización en la formación de OE, se ha comprobado que, si el aire que ejerce el efecto secante se calienta mediante una fuente de calor indirecta, la formación de OE es nula o poco significativa (Missler et al., 1985; Morgan y Armstrong, 1987; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988; Tsai y Hudson, 1985), mientras que si este aire es calentado

directamente a la llama de un mechero, la formación de OE es muy elevada (Missler et al., 1985; Tsai y Hudson, 1985). Esto es debido, según diversos investigadores, a la presencia de óxidos de nitrógeno (NO y NO₂) producidos en la combustión del gas empleado en el mechero (Missler et al., 1985; Tsai y Hudson, 1985; Morgan y Armstrong, 1989). Respecto a este punto, Morgan y Armstrong, en 1987, realizaron una importante comprobación, al añadir N₂O en el aire de un atomizador con fuente de calor indirecta. Este N₂O a las altas temperaturas que se registran en el interior del atomizador, se descompone dando lugar a NO y NO₂. Esto se traducía en un aumento de la formación de OE en los productos desecados. Sobre este punto, existen una serie de trabajos que evidencian que los óxidos de nitrógeno (NO_x) pueden actuar como iniciadores de la autooxidación del colesterol (Sevanian et al., 1979; Smith, 1981) y de los ácidos grasos insaturados (Pryor y Lightsey, 1981).

Otro factor, también relacionado con la elaboración de ovoproductos, son los tratamientos enzimáticos (glucosa oxidasa-catalasa) utilizados para la eliminación de la glucosa, con el fin de evitar el pardeamiento durante la atomización. Este proceso puede incidir en la formación de OE, ya que se ha demostrado (Smith, 1981) que el peróxido de hidrógeno favorece la formación de epóxidos de colesterol (α -CE y β -CE).

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

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

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

Por último, entre la población india de todo el mundo es muy apreciada la mantequilla clarificada (ghee). Esta mantequilla, de forma casera, se obtiene calentando en un recipiente mantequilla normal a 150 °C durante 20-25 min. Industrialmente, existen otros procesos para clarificar

la mantequilla que no exigen un calentamiento tan intenso. Este sencillo método casero implica una notable formación de OE (Jacobson, 1987; Prasad y Subramanian, 1992).

3.5. Procesos de fritura y cocción.

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

Otro de los productos usados como medio de fritura, aunque con menor frecuencia, es la mantequilla. Sobre este producto también se han efectuado estudios para determinar los niveles de OE cuando es sometido a temperaturas elevadas. Uno de los más significativos es el realizado por Sander et al. (1989), en el que se sometió mantequilla, a lo largo de un periodo de 24 días, a un calentamiento continuo a 110 °C y se observó un claro aumento, hasta el octavo día, de la concentración de los siguientes oxiesteroles α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC y 7-CC. A partir de este punto, aunque el 7-CC siguió aumentando, los otros cuatro OE disminuyeron o bien se estabilizaron. Durante este estudio se detectaron, además, bajas concentraciones de 25-HC y CT. Otro trabajo de gran importancia es el de

Csiky (1982), que consistió en someter mantequilla a 180°C durante cinco o diez minutos, con lo cual observó que la misma pasaba de contener solamente trazas de 25-HC, a presentar cantidades apreciables de: 7α -HC, 7β -HC, 25-HC, 7-CC y 4β -HC. Más recientemente, diferentes trabajos han incidido en el tema (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1988 a; Pie et al., 1990) llegando a idénticas conclusiones. Según esto, parece que calentamientos superiores a 170°C por espacio de 5-10 minutos son suficientes para inducir la formación de OE en la mantequilla.

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

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

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer la inestimable colaboración de Carmen Sala Villaplana en la parte gráfica del trabajo. Este trabajo ha sido realizado, en parte, gracias a una beca de la "Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica" (CIRIT).

BIBLIOGRAFIA.

- Addis, P.B., Emanuel, H.A., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1989).- "Capillary GC quantification of cholesterol oxidation products in plasma lipoproteins of fasted humans".- *Free Radical Biol. Med.* **7**, 179-182.
- Addis, P.B. y Park, S.W. (1992).- "Cholesterol oxide content of foods" en "Biological effects of cholesterol oxides" p. 71-88.- S.K. Peng y R.J. Morin (Ed.).- CRC Press, Boca Raton-Ann Arbor-Londres.
- Acker, L. y Greve, H. (1963).- "Über die Photoxydation des Cholesterins in Eihaltigen Lebensmitteln".- *Fette Seif. Anstrich.* **65**, 1009-1012.
- Bascoul, J., Domergue, N. y Crastes de Paulet, A. (1985).- "Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in dietary fats".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 623a.
- Bascoul, J., Domergue, N., Mourot, J., Debry, G. y Crastes de Paulet, A. (1986 a).- "Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 α -epoxy-5 α -cholesta-3 β -ol by the male Wistar rat".- *Lipids* **21**, 744-747.
- Bascoul, J., Domergue, N., Olle, M. y Crastes de Paulet, A. (1986 b).- "Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID".- *Lipids* **21**, 383-387.
- Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1941).- "Autoxydation of sterols in colloidal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol".- *J. Biol. Chem.* **141**, 597-610.
- Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1942 a).- "Autoxydation of sterols in colloidal aqueous solution III. Quantitative studies on cholesterol".- *J. Biol. Chem.* **145**, 309-322.
- Bergström, S. y Wintersteiner, O. (1942 b).- "Autoxydation of sterols in colloidal aqueous solution IV. Influence of esterification and of constitutional factors".- *J. Biol. Chem.* **145**, 327-333.
- Bernheimer, A.W., Robinson, W.G., Linder, R., Mullins, D., Yip, Y.K., Cooper, N.S., Seidman, I. y Uwajima, T. (1987).- "Toxicity of

- enzymically-oxidized low-density lipoprotein".- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 260-266.
- Bhagavan, H.N. y Nair, P.P. (1992).- "Antioxidants in dietary fats" en "Fatty acids in foods and their health implications" p. 329-336.-C.K. Chow (Ed.).- Marcel Dekker Inc., Nueva York-Basilea-Hong Kong.
- Bischoff, F. (1969).- "Carcinogenic effect of steroids" en "Advances in lipid research" p. 165.-R. Paoletti y D. Kritchevsky (Ed.).- Academic Press, Nueva York ciudad, Nueva York.
- Blackwelder, J.A. y Pike O.A. (1990).- "Oxidative stability of cholesterol-free egg lipid fractions".- *J. Food Sci.* **55**, 92-94, 113.
- Boissonneault, G.A., Hennig, B., Wang, Y., Ouyang, C-M, Krahulik, K., Cunnup, L. y Oeltgen, P-R. (1991).- "Effect of oxysterol-enriched low density lipoprotein on endothelial barrier function in culture".- *Am. Nutr. Metab.* **35**, 226-232.
- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1975).- "Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblast".- *Cell* **6**, 307-316.
- Clemens, M.R., Ruess, M., Bursa, Z. y Waller, H.D. (1987).- "The relationship between lipid composition of red blood cells and their susceptibility to lipid peroxidation".- *Free Radic. Res. Commun.* **3**, 265-271.
- Cleveland, M.Z. y Harris, N.D. (1987).- "Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk".- *J. Food Prot.* **50**, 867-871.
- Comstock, G.W., Helzlsouer, K.J. y Bush, T.L. (1991).- "Prediagnostic serum levels of carotenoids and vitamin E as related to subsequent cancer in Washington County, Maryland".- *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (supl.), 260-264S.
- Crastes de Paulet, A., Astruc, M.E. y Bascoul, J. (1988).- "Les oxystérols: Propriétés biologiques et problèmes nutritionnels" en "Biologie des lipides chez l'homme" p. 154-174. Editions Médicales Internationales, Paris, Francia.
- Csallany, A.S., Kindom, S.E., Addis, P.B. y Lee, J-H. (1989).- "HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues".- *Lipids* **24**, 645-651.
- Csiky, I. (1982).- "Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by absorption high performance liquid chromatography".- *J. Chromatogr.* **24**, 381-389.
- Chen, H.W., Kandutsch, A.A. y Waymouth, C. (1974).- "Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol".- *Nature.* **251**, 419-421.
- Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968 a).- "Photooxidation of cholesterol in spray-dried egg yolk upon irradiation".- *J. Food Sci.* **3**, 581-587.
- Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968 b).- "Isolation and characterization of cholesterol-5 β ,6 β -oxide from an aerated aqueous dispersion of cholesterol".- *Lipids* **3**, 335-339.
- Danielson, H. y Horning, M.G. (1962).- "On the oxidation of cholesterol by blood in vitro".- *Acta Chem. Scand.* **16**, 774-775.
- De Vore, V.R. (1988).- "TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef".- *J. Food Sci.* **53**, 1058-1061.
- Duthie, G.G. (1991).- "Antioxidant hypothesis of cardiovascular disease".- *Trends in Food Sci. Tech.* **Agosto 1991**, 205-207.
- Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1991).- "Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols".- *J. Food Sci.* **56**, 843-847.
- Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G. y Waeg, G. (1991).- "Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein".- *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (supl.), 314-321.
- Finocchiaro, E.T., Lee, K. y Richardson, T. (1984).- "Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 877-883.
- Finocchiaro, E.T. y Richardson, T. (1983).- "Sterol oxides in foodstuffs: a review".- *J. Food Prot.* **46**, 917-925.
- Fioriti, J.A. y Sims, R.J. (1967).- "Autoxidation products from cholesterol".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **44**, 221-224.
- Fitch, B. (1994).- "Antioxidants: health implications".- *INFORM* **5**, 242-251.
- Florez, J., Armijo, A.J. y Mediavilla, A. (1987).- "Farmacología humana" Vol. 2, p. 676-679.-EUNUSA, Pamplona, España.
- Fontana, A., Antoniazzi, F., Cimino, G., Mazza, G., Trivellone, E. y Zanone, B. (1992).- "High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk".- *J. Food Sci.* **57**, 869-879.
- Fornas, E., Martínez-Sales, V., Camafías, A. y Baguena, J. (1984).- "Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in the rat".- *Arch. Farmacol. Toxicol.* **10**, 175-182.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. y Kinsella, J.E. (1993).- "Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol".- *The Lancet* **341**, 1103.
- Gey, K.F., Brubacher, G.B. y Stahelin, H.B. (1987).- "Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer".- *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 1368-1377.
- Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P. y Moser, U.K. (1991).- "Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology".- *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (supl.), 326-334S.
- Gibbons, G.F. (1983).- "Molecular control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the role of oxygenated sterols" en "3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase" p. 153-168.-J.R Sabine (Ed.).- CRCP press Inc., Boca Ratón, Florida, EUA.
- Gilbert, J.D., Brooks, C.J.W. y Harland, W.A. (1972).- "Lipids of human atheroma. VII. Isolation of diesters of cholest-5-ene-3 β ,26-diol from extracts of advanced atherosclerotic lesions of human aorta".- *Biochim. Biophys. Acta* **270**, 149-155.
- Gumulka, J., Pyrek, J.S. y Smith, L.L. (1982).- "Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols".- *Lipids* **17**, 197-203.
- Gutteridge, J.M.C. (1978).- "The membrane effects of vitamin E, cholesterol and their acetates on peroxidative susceptibility".- *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **22**, 563-572.
- Harper, H.A., Rodwell, V.W. y Mayes, P.A. (1980).- "Manual de química fisiológica" p. 918-926.- Manual moderno, Méjico D.F., Méjico.
- Herian, A.M. y Lee, K. (1985).- "7 α - and 7 β -hydroxycholesterols formed in a dry egg nogmix exposed to fluorescent light".- *J. Food Sci.* **50**, 276-277.
- Herrera, E. (1986).- "Bioquímica" p. 954-962.-Interamericana. Madrid, España.
- Higley, N.A., Taylor, S.L., Herian, A.M. y Lee, K. (1986).- "Cholesterol oxides in processed meats".- *Meat Sci.* **16**, 175-188.
- Hubbard, R.W., Ono, Y. y Sánchez, A. (1989).- "Atherogenic effect of oxidized products of cholesterol".- *Prog. Food Nutr. Sci.* **13**, 17-44.
- Hwang, K.T. y Maerker, G. (1993 a).- "Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 371-375.
- Hwang, K.T. y Maerker, G. (1993 b).- "Determination of 6-ketocholestanol in unirradiated and irradiated chicken meats".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 789-792.
- Jacobson, M.S. (1987).- "Cholesterol oxides in indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in indian immigrant populations".- *Lancet Septiembre* **19**, 656-658.
- Jain, S.K. y Shohet, S.B. (1981).- "Apparent role of cholesterol as an erythrocyte membrane antioxidant".- *Clin. Res.* **29**, 336a.
- Karel, M. (1980).- "Lipid oxidation secondary reactions and water activity of foods" en "Autoxidation in food and biological systems" p. 191.-M.G. Simic y M. Karel (Ed.).- Plenum Press, Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.
- Kandutsch, A.A. y Chen, H.W. (1973).- "Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol".- *J. Biol. Chem.* **248**, 8408-8417.
- Knekt, P., Aromaa, A., Maatela, J., Aaran, R-K., Nikkari, T., Hakama, M., Hakulinen, T., Peto, R. y Teppo, L. (1991).- "Vitamin E and cancer prevention".- *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (supl.), 283-286S.
- Kok, F.J., Van Poppel, G., Melse, J., Verheul, E., Schouten, E.G., Kruyssen, D.H.C.M. y Hofman, A. (1991).- "Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary atherosclerosis?".- *Atherosclerosis* **31**, 85-90.
- Lee, K., Herian, A.M. y Higley, A. (1985).- "Sterol oxidation products in french fries and in stored potato chips".- *J. Food Prot.* **48**, 158-161.
- Luby, J.M., Gray, J.I., Harte, B.R. y Ryan, T.C. (1986).- "Photooxidation of cholesterol in butter".- *J. Food Sci.* **51**, 904-923.
- Luc, G. y Fruchart, J-C. (1991).- "Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis".- *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (supl.), 206-209S.
- Maerker, G. (1987).- "Cholesterol autoxidation-current status".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 388-392.
- Maerker, G. y Bunick, F.J. (1986).- "Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 771-777.
- Maerker, G. y Jones, K.C. (1992).- "Gamma-irradiation of individual cholesterol oxidation products".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 451-455.
- Missler, S.R., Wasilchuk, B.A. y Merritt, C. (1985).- "Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations".- *J. Food Sci.* **50**, 595-598, 646.
- Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1987).- "Formation of cholesterol-5,6-epoxides during Spray-drying of egg yolk".- *J. Food Sci.* **52**, 1224-1227.
- Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1989).- "Wide-bore capillary gas chromatographic method for quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder".- *J. Food Sci.* **54**, 427-429, 457.
- Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1992).- "Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating".- *J. Food Sci.* **57**, 43-45, 107.

- Naber, E.C., Allred, J.B., Winget, J. y Stock, A.E. (1985).- "Effect of cholesterol oxidation products on cholesterol metabolism in laying hen".-Poult. Sci. **64**, 675-680.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1987).- "Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products".- J. Food Sci. **52**, 57-62, 67.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988 a).- "Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Butter and cheese".- J. Am. Oil Chem. Soc. **65**, 1635-1641.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988 b).- "Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Milk powder products".-J. Food Sci. **53**, 74-79, 87.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1989).- "Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Lard and bacon".- J. Am. Oil Chem. Soc. **66**, 586-592.
- Oshima, T., Li, N. y Koizumi, C. (1993).- "Oxidative decomposition of cholesterol in fish products".-J. Am. Oil Chem. Soc. **70**, 595-600.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1985).- "HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods".- J. Food Sci. **50**, 1437-1441, 1444.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986 a).- "Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow".- J. Agric. Food Chem. **34**, 653-659.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986 b).- "Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats".- J. Food Sci. **51**, 1380-1381.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1987).- "Cholesterol oxidation products in some muscle foods".-J. Food Sci. **52**, 1500-1503.
- Pearson, A.M., Gray, J.I., Wolzak, A.M. y Horenstein, N.A. (1983).- "Safety implications of oxidized lipids in muscle foods".- J. Food Technol. **37**, 121-129.
- Peng, S.K., Hu, B. y Morin, R.J. (1991).- "Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides".-J. Clin. Lab. **5**, 144-152.
- Peng, S.K., Taylor, C.B., Mosbach, E.H., Huang, W.Y., Hill, J. y Mikkelsen, B. (1982).- "Distribution of 25-hydroxycholesterol in plasma lipoprotein and its role in atherogenesis".- A study in squirrel monkeys.- Atherosclerosis. **41**, 395-402.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1990).- "Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: Identification and quantification of cholesterol oxides".-J. Agric. Food Chem. **38**, 973-979.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1991).- "Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage".- J. Agric. Food Chem. **39**, 250-254.
- Prasad, C.R. y Subramanian, R. (1992).- "Qualitative and comparative studies of cholesterol oxides in commercial and home-made indian ghees".-Food Chem. **45**, 71-73.
- Pryor, W.A. y Lightsey, J.W. (1981).- "Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: Initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid".-Science **214**, 435-437.
- Przybilski, R., Eskin, N.A.M. y Cullimore, D.R. (1993).- "Transformation of egg cholesterol during bacterial transformation".- Food Chem. **48**, 195-199.
- Rankin, S.A. y Pike, O.A. (1993).- "Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in a aqueous model system".- J. Food Sci. **58**, 653-655, 687.
- Rawn, J.D. (1989).- "Bioquímica" Vol 2, p. 564-567.- Interamericana-Mc Graw Hill, Madrid, España.
- Renaud, S. y De Logeril, M. (1992).- "Vin, alcool, plaquettes et coronaropathies: le paradoxe français".-The Lancet (édition française) **225**, 22-25.
- Robertson, J.McD., Donner, A.P. y Trevithick, J.R. (1991).- "A possible role for vitamins C and E in cataract prevention".- Am. J. Clin. Nutr. **53** (supl.), 346-351S.
- Ryan, T.C. (1982).- "Oxidation of cholesterol in heated tallow" en "Safety implications of oxidized lipids in muscle foods".- A.M. Pearson, J.I. Gray, A.M. Wolzak y N.A. Horenstein. (1983).-J. Food Technol. **37**, 121-129.
- Ryan, T.C., Gray, J.I. y Morton, I.D. (1981).- "Oxidation of cholesterol in heated tallow".- J. Sci. Food Agric. **32**, 305-308.
- Sander, B.D., Smith, D.E. y Addis, P.B. (1988).- "Effects of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and cheddar cheese".- J. Dairy Sci. **71**, 3173-3178.
- Sander, B.D., Smith, D.E., Addis, P.B. y Park, S.W. (1989).- "Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products".- J. Food Sci. **54**, 874-879.
- Schulze, E. y Winterstein, E. (1904).- "Über das Verhalten des Cholesterins gegen des Licht" en "Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of oxidation products in dairy products".- B.D. Sander, D.E. Smith, P.B. Addis y S.W. Park. (1989).- J. Food Sci. **54**, 874-879.
- Sevanian, A. y McLeod, L.L. (1987).- "Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers".- Lipids **22**, 627-636.
- Sevanian, A., Mead, J.F. y Stein, R.A. (1979).- "Epoxides as products of lipid autoxidation in rat lungs".-Lipids **14**, 634-643.
- Smith, L.L. (1981).- "Cholesterol autoxidation".-Plenum Press, Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.
- Smith, L.L. (1990).- "Mechanisms of formation of oxysterols: A general survey" en "Free radicals, lipoproteins, and membrane lipids" p. 115-132.- A. Crastes de Paulet et al. (Ed.).Plenum press, Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.
- Smith, L.L. (1991).- "Another cholesterol hypothesis: Cholesterol as antioxidant".- Free Radical Biol. Med. **11**, 47-61.
- Smith, L.L. y Jaworski, K. (1988).- "Cholesterol epoxidations by defined oxygen species" en "Oxygen radicals in biology and medicine".- G. Simic, K.A., Taylor, Ward, J.F. y C. Von Sonntag (Ed.).- Plenum publishing corp., Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.
- Smith, L.L. y Johnson, B.H. (1989).- "Biological activities of oxysterols".- Free Radical Biol. Med. **7**, 285-332.
- Smith, L.L., Kulig, J.M., Miller, D. y Ansari, G.A.S. (1978).- "Oxidation of cholesterol by dioxygen species".- J. Am. Chem. Soc. **100**, 6206-6211.
- Smith, L.L., Matthews, W.S., Price, J.C., Bachmann, R.C. y Reynolds, B. (1967).- "Thinlayer chromatographic examination of cholesterol autoxidation".- J. Chromatogr. **27**, 187-205.
- Smith, L.L. y Stroud, J.P. (1978).- "Sterol metabolism XLII. On the interception of singlet molecular oxygen by sterols".- Photochem. Photobiol. **28**, 479-485.
- Smith, L.L. y Teng, J.I. (1974).- "Sterol metabolism XXIX. On the mechanism of microsomal lipid peroxidation in rat liver".- J. Am. Chem. Soc. **96**, 2640-2641.
- Smith, L.L. y Van Lier, J.E. (1970).- "Sterol metabolism IX. 26-hydroxycholesterol levels in the human aorta".-Atherosclerosis **12**, 1-14.
- Szebeni, J. y Toth, K. (1986).- "Lipid peroxidation in hemoglobin-containing liposomes. Effects of membrane phospholipids composition and cholesterol content".- Biochim. Biophys. Acta **857**, 139-145.
- Teng, J.I., Kulig, M.J., Smith, L.L., Kan, G. y Van Lier, J.E. (1973).- "Sterol metabolism. XX. Cholesterol 7 β -hydroperoxide".-J. Org. Chem. **38**, 119-123.
- Teng, J.I. y Smith, L.L. (1973).- "Sterol metabolism XXIV. On the unlikely participation of singlet molecular oxygen in several enzyme oxygenations".- J. Am. Chem. Soc. **95**, 4060-4061.
- Teng, J.I. y Smith, L.L. (1976).- "Sterol metabolism. XXXVII. On the oxidation of cholesterol by dioxygenases".- Bioorg. Chem. **5**, 99-119.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1984).- "Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Isolation and identification".- J. Food Sci. **49**, 1245-1248.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985).- "Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation".- J. Food Sci. **50**, 229-231, 237.
- Tsai, L.S., Ijichi, K., Hudson, C.A. y Meehan, J.J. (1980).- "A method for the quantitative estimation of cholesterol α -oxide in eggs.-Lipids **15**, 124-128.
- Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-schuil, T.G. y Katan, M.B. (1988).- "Quantification of oxysterols in dutch foods: Egg products and mixed diets".-Lipids **23**, 1079-1085.
- Watabe, T., Kanai, M., Isobe, M. y Ozawa, N. (1980).- "Cholesterol α - and β -epoxides as obligatory intermediates in the hepatic microsomal metabolism of cholesterol to cholestanetriol".- Biochim. Biophys. Acta **619**, 414-419.
- Yan, P.S. y White, P.J. (1990).- "Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol".- J. Am. Oil Chem. Soc. **67**, 927-931.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. y Marinova, E.M. (1985).- "Autoxidation of sitosterol in lipid systems of different unsaturation degree".- J. Am. Oil Chem. Soc. **62**, 622a.
- Zhang, W.B. y Addis, P.B. (1990).- "Prediction of levels of cholesterol oxides in heated tallow by dielectric measurement".- J. Food Sci. **55**, 1673-1675.
- Zhang, W.B., Addis, P.B. y Krick, T.P. (1991).- "Quantification of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol and other cholesterol oxidation products in fast food french fried potatoes".- J. Food Sci. **56**, 716-718.
- Zubillaga, M.P. y Maerker, G. (1991).- "Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken".- J. Food Sci. **56**, 1194-1202.

Recibido: Octubre 1994
Aceptado: Marzo 1995