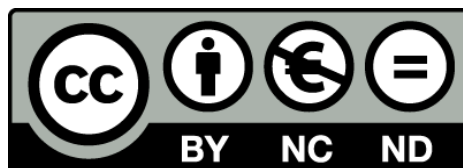




Estudio de la capacidad *fat-binding* selectiva de fibras alimentarias y su repercusión sobre el metabolismo lipídico

Jonathan Santas Gutiérrez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD *FAT-BINDING* SELECTIVA DE FIBRAS
ALIMENTARIAS Y SU REPERCUSIÓN SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO**

Jonathan Santas Gutiérrez

2013



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO: Alimentación y Nutrición

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD *FAT-BINDING* SELECTIVA DE FIBRAS
ALIMENTARIAS Y SU REPERCUSIÓN SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO**

Memoria presentada por

Jonathan Santas Gutiérrez

para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por,

Dra. Magdalena Rafecas Martínez

Jonathan Santas Gutiérrez

Barcelona, Mayo 2013

Este trabajo ha contado con la financiación de:

- El Programa de Fomento de la Investigación Técnica (Ministerio de Ciencia e Innovación, España) y la industria S.A. DAMM mediante la concesión del proyecto CIT-060000-007-6.
- El Programa Torres Quevedo (Ministerio de Economía y Competitividad, España) mediante la concesión de una ayuda a la empresa AB-Biotics, S.A., para la contratación de Jonathan Santas.

Este trabajo ha contado con el soporte técnico de AB-Biotics, S.A.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Sin duda, una fuente de motivación constante para llegar al final de esta etapa ha sido poder tener la oportunidad de escribir este apartado. No haberlo conseguido hubiese supuesto desmerecer el trabajo y el apoyo de las muchas personas que me han ayudado a lo de este largo y no poco complicado camino.

En primer lugar debo mostrar mi agradecimiento a mi directora, Magda Rafecas, por haberme permitido formar parte de este proyecto, iniciarme en esta Tesis y por ofrecerme su entera confianza durante esta etapa. Me gustaría también mostrar mi agradecimiento al resto de profesores del grupo. A Rafael Codony y Josep Boatella por su calidad humana, por su disposición a resolver dudas y por hacerme sentir integrado en el grupo desde el primer momento. A Francesc Guardiola por compartir su conocimiento, su sentido del humor y por sus palabras de ánimo en los momentos duros.

Agradezco especialmente la ayuda de todos los que en algún momento han formado parte de la gran familia del laboratorio durante todos estos años. En primer lugar a Alba Tres, a quién lamento, que por motivos de formato, no pueda dedicar el anexo de agradecimientos que se merece. Por ser esa mamá que me ha enseñado a dar los primeros pasos, por todas sus críticas constructivas y por su apoyo científico y sobre todo anímico. A Ricard Bou, por ser ese hermano mayor siempre dispuesto a ofrecer consejo y por compartir todos esos momentos de desesperante trabajo donde la cordura parecía abandonarnos. A Carla Nuchi, por ser esa tía con quien resolver dudas o compartir un café y soportar con humor todas mis bromas políticamente incorrectas. A las germanetes Mercedes Alemán y Núria Magrinyà, por aguantar estoicamente mi desorden mental, los efectos colaterales del muestreo y el trabajo de laboratorio, y sobre todo por ayudarme a reír cuando las cosas estaban para llorar. A Marina Diana y a todos los estudiantes que han ayudado durante las analíticas, a quien intento listar cronológicamente aún a riesgo de olvidarme a alguien, ya que sería injusto no intentarlo: a Sílvia Scapuzzi, Anna Gonciarz, Natalia Andújar, Cristian Fita, Diana Abou-Khalil, Valeria Guzmán, Marc Jané, Xavi Charles, Gisselle Rodríguez

y Yeimmy Guzmán. Me gustaría hacer especial mención a Ánder Aldanondo y Raquel Pastor, por haberme ofrecido la mejor de las ayudas en la peor de las tareas sin esperar nada a cambio. Espero poderos devolver algún día el favor. También me gustaría agradecer a Gemma Brufau el haber compartido altruistamente su experiencia y haber estado, pese a la distancia, muy presente a lo largo de esta tesis.

Aprovecho también para mostrar mi agradecimiento al resto de miembros y compañeros del departamento con los que he compartido estos años. En especial a Montse Aymami, por ayudarme a sobrevivir entre facturas y papeleos varios. A Ana Isabel Castellote, por su paciencia y privilegiadas clases privadas de cromatografía. A “Anita”, por evitar que me quede pegado a la mesa, y hacer más llevadera mi enemistad con los ácaros y menos tristes los solitarios 31 de diciembre. Y a María Izquierdo y María Rochés por hacer más digerible la burocracia doctoral.

Me gustaría expresar mi gratitud a todo el personal del estabulario por hacer que “bajar a las mazmorras” fuera como sentirse en casa. A Tere Rodrigo por todas sus enseñanzas, amabilidad y por sus tranquilizadores “tú no patisques” en los momentos más críticos. A Marta, David y Paula por su ayuda y aguantar mis manías de purismo metodológico. A Luisa por ayudarme a mantener impecables a mis “niñas” pese a que no lo ponían fácil.

Agradezco a todos los compañeros de AB-Biotics el haberme hecho sentir acogido en esta nueva etapa. Gracias a Miquel Àngel Bonachera y Sergi Audívert por confiar en mi trabajo y darme sustento para continuar, y sobre todo a Jordi Cuñé y Jordi Espadaler por ser compañeros de batallas y ayudarme a no morir en ellas.

Por último, me gustaría agradecer a Anutxi su aporte profesional con los diseños, acabando de convertir la portada de este manuscrito en un libro. Dejo también en último lugar los evidentes agradecimientos al resto de mi familia, precisamente por ser los más emotivos. Por educarme en la cultura del esfuerzo, por su incondicional apoyo y por comprender y soportar la importancia de un reto que rozó el límite de la obsesión. Sin vosotros esta tesis no sólo hubiese sido imposible

sino también impensable. Mi más sentido agradecimiento a Amatsu por todo su cariño y apoyo; porque lamento que la vida no te haya permitido ver el fruto de nuestro esfuerzo, pero espero que este escrito sirva como prueba imperecedera de que lo tuvo. Y a estas alturas las palabras se quedan cortas para expresar mi agradecimiento a Lorena. Por estar a mi lado en los momentos difíciles y los horribles, por soportar todos mis momentos de desesperación (que no han sido pocos) y ayudarme a mantener la salud mental, y por ofrecerme cariño cuando yo sólo podía ofrecer estrés. Por todo el tiempo que esta Tesis nos ha robado. Porque el tiempo para los buenos momentos tiene que llegar ahora y espero que lo vivamos juntos.

¡GRACIAS A TODOS!

La lectura es como el alimento; el provecho no está en proporción de lo que se come, sino de lo que se digiere.

Jaume Lluçà Antoni Balmes

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: PRIMERA CAUSA DE MORTALIDAD.....	19
1.2. OBESIDAD: UN PROBLEMA CRECIENTE A NIVEL MUNDIAL.....	22
1.3. ATROSCLEROSIS: UNA PATOLOGÍA COMPLEJA QUE INVOLUCRA DIFERENTES PROCESOS.	24
1.4. COLESTEROL: IMPORTANTE FACTOR DE RIESGO ASOCIADO A LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	27
1.4.1. <i>Metabolismo del colesterol</i>	28
1.5. COMPOSICIÓN DE LA GRASA Y METABOLISMO LIPÍDICO: EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	35
1.5.1. <i>Colesterol</i>	35
1.5.2. <i>Ácidos grasos saturados</i>	37
1.5.3. <i>Ácidos grasos monoinsaturados</i>	39
1.5.4. <i>Ácidos grasos poliinsaturados</i>	39
1.5.5. <i>Ácidos grasos trans</i>	44
1.6. PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES A TRAVÉS DE INTERVENCIONES DIETÉTICAS.	45
1.7. FIBRA ALIMENTARIA	48
1.7.1. <i>Concepto de fibra alimentaria</i>	48
1.7.2. <i>Clasificación y estructura</i>	50
1.7.3. <i>Fibra alimentaria y enfermedades cardiovasculares</i>	54
1.7.4. <i>Efectos beneficiosos de la fibra alimentaria</i>	55
1.7.5. <i>Goma guar parcialmente hidrolizada</i>	64
1.7.6. <i>Maltodextrina resistente a la digestión</i>	66
1.7.7. <i>Qitosano</i>	69
2. OBJETIVOS	75
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	81
3.1. INTRODUCCIÓN AL DISEÑO EXPERIMENTAL	83
3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y ANIMALES.....	83
3.2.1. <i>La cobaya como modelo de experimentación animal</i>	84
3.2.2. <i>Diseño primera fase experimental</i>	85
3.2.3. <i>Diseño segunda fase experimental</i>	88
3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS REALIZADAS	90

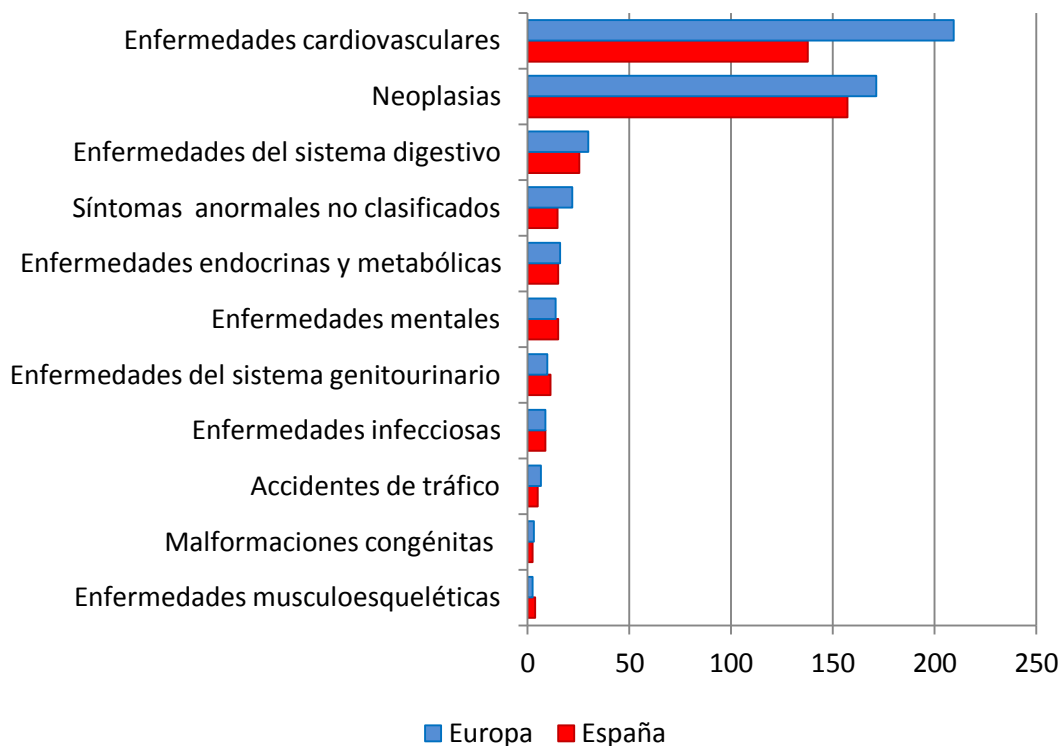
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
4.	RESULTADOS.....	93
4.1.	LA GOMA GUAR PARCIALMENTE HIDROLIZADA REDUCE LA ABSORCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES DE LA DIETA EN COBAYAS INDEPENDIEMENTE DE SU VISCOSIDAD.	97
4.2.	EFFECTO SELECTIVO <i>IN VIVO</i> DEL QUITOSANO SOBRE LA EXCRECIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, ESTEROLES NEUTROS Y ÁCIDOS BILIARES: UN ESTUDIO LONGITUDINAL.....	109
4.3.	EFFECTO DE LA GOMA GUAR PARCIALMENTE HIDROLIZADA, LA MALTODEXTRINA RESISTENTE A LA DIGESTIÓN Y EL QUITOSANO EN EL CONTENIDO LIPÍDICO Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASMA E HÍGADO DE COBAYAS	119
4.4.	COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOLIPIDÉMICA DE QUITOSANOS DE ALTA Y BAJA VISCOSIDAD EN COBAYAS: EFFECTO SOBRE EL CONTENIDO LIPÍDICO Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASMA E HÍGADO.....	147
4.5.	DETERMINACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS TOTALES EN PLASMA MEDIANTE EL USO DEL FLUORÓFORO DIFENIL-1-PIRENILFOSFINA	183
5.	DISCUSIÓN GENERAL	191
5.1.	INTRODUCCIÓN A LA DISCUSIÓN.....	193
5.2.	EFFECTO SOBRE EL CONSUMO DE PIENSO Y PESO DEL ANIMAL.....	195
5.3.	EFFECTO SOBRE LA EXCRECIÓN DE ESTEROLES NEUTROS Y ÁCIDOS BILIARES, Y REPERCUSIÓN SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	198
5.4.	EFFECTO SOBRE LA EXCRECIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	203
5.5.	EFFECTO SOBRE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE PLASMA E HÍGADO	208
5.6.	EFFECTO DEL CONSUMO DE QUITOSANO SOBRE EL NIVEL DE OXIDACIÓN DEL PLASMA	214
5.7.	MECANISMOS ASOCIADOS AL EFFECTO HIPOLIPIDÉMICO DE LAS FIBRAS ESTUDIADAS.....	218
6.	CONCLUSIONES	225
7.	BIBLIOGRAFÍA	229
8.	ANEXO	263
8.1.	ABREVIACIONES	265
8.2.	LISTADO DE TABLAS.....	267
8.3.	LISTADO DE FIGURAS	268

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: PRIMERA CAUSA DE MORTALIDAD

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2008 se registraron a nivel mundial 17,3 millones de muertes por esta causa, lo que representa el 30% del total de muertes registradas. Aproximadamente entre el 38-46% de estas muertes se debieron a cardiopatías isquémicas y entre el 34-37% se debieron a problemas cerebrovasculares (World Health Organization (WHO), 2011a). Más concretamente, en Europa, las ECV fueron la primera causa de muerte (36% de las muertes registradas), mientras que en España fue la segunda (28% de las muertes registradas) sólo por detrás de las muertes causadas por neoplasias (tumores y cáncer) (Eurostat, 2010) (**Figura 1-1**). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV y probablemente seguirá siendo la principal causa de muerte a nivel mundial (World Health Organization (WHO), 2011b).

Figura 1-1: Tasa bruta de mortalidad por causas específicas en Europa y España (Año 2010)



Muertes por cada 100.000 habitantes. Fuente: Eurostat (2010)

La patología subyacente más frecuente de este tipo de enfermedades es la aterosclerosis, principal responsable de cardiopatías coronarias, enfermedades cerebrovasculares y arteriopatías periféricas. Otros ejemplos de enfermedades cardiovasculares no directamente relacionadas con la aterosclerosis son las cardiopatías reumáticas y las congénitas, las cardiomiopatías y las arritmias (Lloyd-Jones et al., 2010a; World Health Organization (WHO), 2011b; World Health Organization (WHO), 2012a).

Tabla 1-1: Principales enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo

Enfermedades cardiovasculares	Factores de riesgo:
<p><u>Asociadas a aterosclerosis:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades isquémicas del corazón (p.ej. infarto de corazón) • Enfermedades cerebrovasculares (p.ej. embolias) • Enfermedades de la vena aorta y las arterias (hipertensión y enfermedades de vasos periféricos) <p><u>Otras enfermedades cardiovasculares:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades congénitas del corazón • Cardiopatías reumáticas • Cardiomiopatías • Arritmias cardiacas 	<p><u>Relacionados con estilos de vida:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tabaco • Sedentarismo • Dieta poco saludable • Abuso de alcohol <p><u>Factores de riesgo metabólicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión • Diabetes • Hiperlipidemia <p><u>Otros factores:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Bajo nivel cultural • Edad avanzada • Género • Predisposición genética • Factores psicológicos (p.ej. estrés) • Otro factores (p.ej. exceso homocisteína)

Adaptado de World Health Organization (WHO) (2011b)

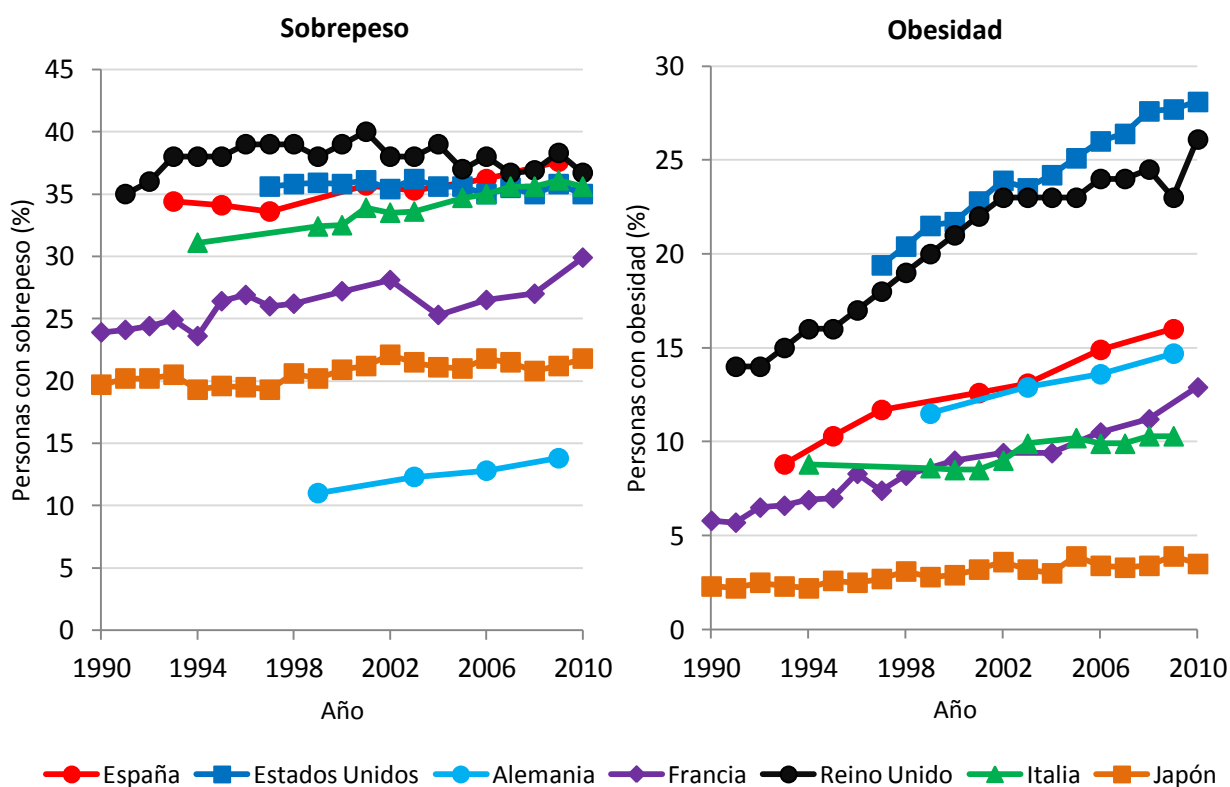
Los factores de riesgo asociados a la aterosclerosis pueden dividirse en factores de riesgo modificables y no modificables. Factores como la edad avanzada, el género y la predisposición genética son ejemplos de factores de riesgo no modificables. Los factores de riesgo modificables son responsables aproximadamente del 80% de los casos de

cardiopatías coronarias y enfermedades cerebrovasculares. Entre estos factores destacan el tabaquismo, el consumo nocivo de alcohol, la inactividad física y una dieta malsana, principalmente debido a un elevado consumo de calorías y sal. La exposición continuada a estos últimos factores puede causar obesidad, un aumento de la presión arterial (hipertensión) y un incremento de los niveles de azúcar (diabetes) y lípidos en sangre (dislipémias). Estos son a su vez importantes factores de riesgo (Frohlich & Al-Sarraf, 2013; World Health Organization (WHO), 2012a).

1.2. OBESIDAD: UN PROBLEMA CRECIENTE A NIVEL MUNDIAL

El sobrepeso y la obesidad¹ son un problema creciente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En 1997, la OMS reconoció formalmente la obesidad como un problema de magnitudes epidémicas (James, 2008). En base a estudios recientes se estima que, a nivel mundial, el índice de masa corporal (IMC) aumenta a un ritmo de 0,4 kg/m² en hombres y un 0,5 kg/m² en mujeres por década desde 1980. A nivel global, entre 1980 y 2008, la prevalencia de la obesidad incrementó del 4,8 al 9,8% en hombres y del 7,9 al 13,8% en mujeres (Finucane et al., 2011).

Figura 1-2: Evolución de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en diferentes países.



Datos de prevalencia de sobrepeso y obesidad para ambos sexos. Fuente: OCDE (2011)

¹ En base a los criterios de la OMS se entiende como personas con sobrepeso a aquellas con un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 25 y personas con obesidad aquellas con un IMC igual o superior a 30. Aunque resulta evidente que las personas con obesidad son a su vez personas con sobrepeso en el presente apartado se diferencian los dos grupos con finalidades estadísticas, entendiendo como sobrepeso un grupo de personas con un IMC ≥ 25 pero inferior a 30.

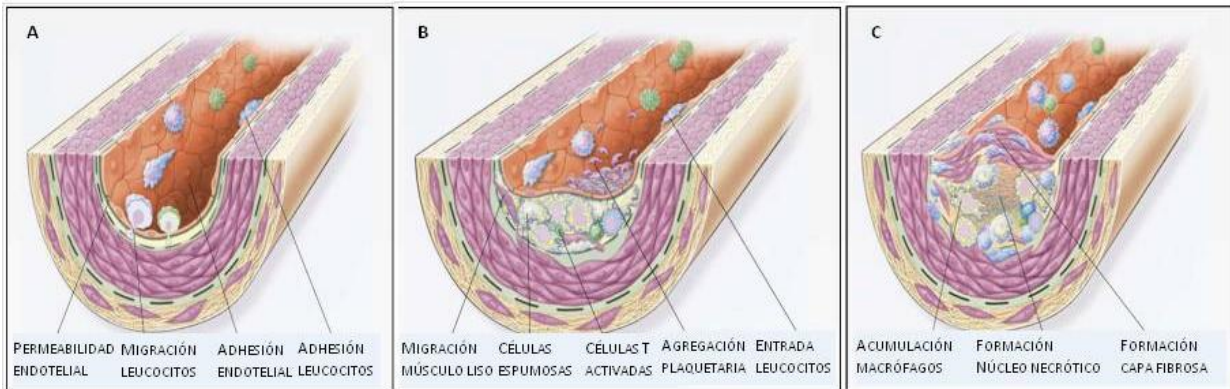
Se calcula que 500 millones de adultos presentaban obesidad en el año 2008, lo que representa el 10-14% de la población mundial (Malik et al., 2013). En países como Estados Unidos un 70,2% de los hombres y un 56,1% de las mujeres presentaban sobrepeso u obesidad en el año 2010. En España, estos porcentajes fueron del 62,8% en hombres y el 44,6% en mujeres (año 2009), situándose entre los países europeos con una mayor tasa de sobrepeso y obesidad (OECD, 2011). Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) dos de cada tres hombres presenta sobrepeso y una de cada seis personas padece obesidad en España. La OCDE prevé además que la proporción de adultos con sobrepeso puede aumentar (en España) aproximadamente un 10% más en los próximos años (OECD, 2012).

La obesidad está involucrada en numerosos problemas metabólicos, ya que afecta a procesos como el control de glucosa, lípidos y presión sanguínea. Es, por lo tanto, el origen de un conjunto de condiciones conocido como síndrome metabólico (Misra & Khurana, 2008). Se calcula que la obesidad y el sobrepeso suponen el 44% de la carga de diabetes, el 23% de las cardiopatías isquémicas, y se estima que entre el 7-41% de la carga de algunos tipos de cáncer, siendo el quinto factor de riesgo de defunción a nivel mundial (World Health Organization (WHO), 2012b). Además, la OCDE calcula que la carga de coste médico es un 25% superior en personas obesas, suponiendo también un problema de importancia económica (OECD, 2012).

1.3. ATEROSCLEROSIS: UNA PATOLOGÍA COMPLEJA QUE INVOLUCRA DIFERENTES PROCESOS

La aterosclerosis es un proceso patológico complejo que tiene lugar en los vasos sanguíneos y cuyo desarrollo se produce a lo largo de los años. En concreto, la aterosclerosis se define como una alteración patológica de las arterias coronarias, caracterizada por el depósito anormal de lípidos y tejido fibroso en la pared arterial, que desorganiza la arquitectura y la función de los vasos reduciendo de forma variable el flujo sanguíneo (Perrotta, 2013; Stary et al., 1995).

El proceso de formación de la placa aterosclerótica se inicia debido a una pequeña lesión conocida como *estría lipídica* o adiposa (Frayn, 1998). Debido a procesos mecánicos, químicos, biológicos o inmunológicos se puede producir un daño en el endotelio vascular, la zona más interna de la íntima arterial en contacto con el torrente sanguíneo. En condiciones fisiológicas normales, las lipoproteínas se depositan y salen del espacio endotelial. No obstante, cuando hay un daño puede favorecerse su adhesión y acumulación. Además, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pueden ser modificadas por procesos de glicación, agregación, asociación con proteoglicanos y sobre todo por oxidación, lo que hace que también puedan tener un efecto citotóxico y dañar el endotelio (Steinberg, 1997). Cuando las LDL quedan atrapadas, se favorece también su progresiva oxidación. Las LDL oxidadas (LDL_{ox}) inducen además la expresión de factores inflamatorios como el factor tumoral necrosis alfa (TNF- α) o la interleucina 1 (IL-1), las cuales favorecen la expresión de moléculas de adhesión endotelial, atraen monocitos y favorecen su acumulación. Los factores inflamatorios generan un estímulo quimiotáctico que induce la entrada de los monocitos a la íntima, donde maduran a macrófagos, los cuales expresan receptores “basura” (*scavengers*), que les permiten fagocitar LDL modificadas y transformarse en células espumosas cargadas de lípidos (Ross, 1999).

Figura 1-3: Proceso resumido de formación de la placa aterosclerótica

En resumen: A) las lesiones que preceden a la formación de la placa aterosclerótica tienen lugar en el endotelio, lo que aumenta su permeabilidad a las lipoproteínas y otros componentes plasmáticos. B) La estría lipídica consiste en una acumulación inicial de monocitos, macrófagos cargados de lípidos (células espumosas), linfocitos T y posteriormente células del músculo liso. C) En fases avanzadas se forman núcleos necróticos y una cubierta fibrosa, la ruptura de la cual es la principal responsable de la formación de trombos y la mayoría de infartos agudos. *Adaptado de Ross, R. (1999).*

En la íntima, los macrófagos también estimulan la formación de factores de crecimiento y citoquinas, que amplifican el proceso inflamatorio, pueden ejercer función quimiotáctica y atraer más monocitos y favorecer que células musculares lisas de la pared arterial se transformen en macrófagos y finalmente en células espumosas. La acumulación de este tipo de células conlleva la liberación de enzimas hidrolíticas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, que pueden incrementar el daño y, eventualmente, causar una necrosis focal. Además de los monocitos, los linfocitos T (o células T) están involucrados en el proceso inflamatorio. Estas células pueden activarse por la presencia de antígenos presentes en los macrófagos, lo que conlleva la secreción de citoquinas, incluyendo interferón- γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor alfa*) y β , que incrementan la respuesta inflamatoria (Galkina & Ley, 2009; Ross, 1999).

Debido a que esta placa es de consistencia blanda, la pared endotelial puede producir colágeno y fibrinógeno, lo que estabiliza la placa. No obstante, la capa fibrosa puede degradarse por la acción de metaloproteinasas tales como colagenasas, elastasas y estromelisin. Las células T activadas pueden estimular la producción de metaloproteinasas, lo que incrementa la inestabilidad de la placa. La erosión y la ruptura

de la capa fibrosa y la trombosis secundaria causa la mayoría de casos de infarto de miocardio (Páramo et al., 2003).

En resumen, las placas ateroscleróticas consisten en núcleos necróticos, regiones calcificadas, lípidos modificados, células del músculo liso inflamadas, células endoteliales, leucocitos y células espumosas (*foam cells*). Las características de la placa aterosclerótica denotan que se trata de una patología compleja que conlleva procesos que involucran al sistema vascular, metabólico e inmune. Aunque la concentración de LDL, y más concretamente LDLox, es un factor importante, la inflamación está vinculada a múltiples factores de riesgo de la aterosclerosis y está presente durante todo el proceso (Galkina & Ley, 2009; Ross, 1999).

1.4. COLESTEROL: IMPORTANTE FACTOR DE RIESGO ASOCIADO A LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El riesgo de padecer ECV aumenta cuando los niveles de colesterol son elevados, especialmente cuando se trata de colesterol transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y otras lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (apoB) (Mangiacapra et al., 2012; Okuzumi et al., 2013). El problema resulta más grave cuando además los niveles de lipoproteína de baja densidad (HDL) son bajos, ya que es necesaria para el transporte reverso del colesterol y el mantenimiento de una buena salud cardiovascular (Bautista, 2012; Gordon et al., 2011). Aproximadamente, un tercio de las enfermedades isquémicas del corazón son debidas a unos niveles de colesterol elevados. En 2008, la prevalencia global de niveles de colesterol, definida por unos niveles $\geq 6,2$ mmol/L (240 mg/dL) fue del 9,7% (8,5% para hombres y 10,7% para mujeres), mientras que para unos niveles ≥ 5 mmol/L (193 mg/dL) fue del 39% (37% en hombres y 40% en mujeres). Los porcentajes de prevalencia más elevados se encuentran en las regiones de Europa y América, siendo superiores los niveles en aquellos países de mayor renta per capita (World Health Organization (WHO), 2011c).

En base a esto, con la finalidad de disminuir el riesgo de padecer ECV, uno de los principales objetivos es la reducción de los niveles de colesterol total y LDL (Frohlich & Al-Sarraf, 2013). De hecho, en base al meta-análisis de diferentes estudios clínicos, se estima que el riesgo de padecer complicaciones coronarias de gravedad puede disminuir aproximadamente un 22% por cada reducción de 40 mg/dL en los niveles de colesterol LDL (Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, 2005). Tanto la American Heart Association como la Sociedad Española de Cardiología recomiendan unos niveles de colesterol total inferiores a 200 mg/dL, mientras que unos valores de colesterol HDL superiores a 60 mg/dL son considerados beneficiosos (American Heart Association, 2013; Sociedad Española de Cardiología, 2011). Aunque no existe tanto consenso respecto a valores concretos, las diferentes organizaciones gubernamentales también recomiendan que los niveles de colesterol LDL sean inferiores a valores de 115-100 mg/dL,

especialmente en aquellos pacientes con elevado riesgo cardiovascular (Reiner et al., 2011).

1.4.1. Metabolismo del colesterol

El colesterol es un componente de gran importancia para el organismo, ya que tiene un importante papel estructural en las membranas celulares y es precursor de diferentes compuestos como hormonas esteroideas y ácidos biliares (Frayn, 1998).

El intestino procesa entre 1200-1700 mg de colesterol por día procedente de tres fuentes: la dieta (300-500 mg/día en dietas occidentales), la bilis (700-1300 mg/día) y el epitelio intestinal (200-300 mg/día). La cantidad de colesterol absorbida a través de la dieta es muy variable, con valores que oscilan entre el 15-80% y un valor promedio aproximado del 50%. El colesterol restante es excretado, sobre todo en forma de metabolitos secundarios, especialmente coprostanol, por acción del metabolismo de la microbiota intestinal (Lee et al., 2012). La síntesis de colesterol endógena contribuye a los niveles de colesterol circulante de manera sustancialmente superior al absorbido a través de la dieta, con valores de 700-900 mg/día, lo que supone una aportación de entre el 60-80% a la concentración de colesterol total (MacKay & Jones, 2011).

Debido a su naturaleza hidrofóbica el colesterol (tanto de la dieta como de origen endógeno) es transportado en la sangre en forma de lipoproteínas. Las lipoproteínas son un grupo heterogéneo de partículas que difieren en tamaño y composición, principalmente constituidas por una combinación de lípidos y proteínas. En general, consisten en un núcleo de colesterol esterificado y triglicéridos, envuelto por una monocapa constituida principalmente por fosfolípidos, pero también por apolipoproteínas y una pequeña cantidad de colesterol libre (Biggerstaff & Wooten, 2004). Los diferentes tipos de lipoproteínas y su composición se resumen en la **Tabla 1-2**. Las lipoproteínas son clasificadas en base a su densidad, la cual viene determinada por su composición lipídica. Pese a esta clasificación, el contenido en apolipoproteínas es el principal determinante de la función, el tipo y la cantidad de lípidos acumulados en las lipoproteínas, ya que además de ser un importante componente estructural, las apolipoproteínas sirven como lugar de

unión a receptores específicos y como cofactores de determinadas enzimas. Por otra parte, los cambios de contenido lipídico que tienen lugar en las lipoproteínas pueden alterar la conformación de las apolipoproteínas, lo que conlleva una modificación de su estructura terciaria y modifica su afinidad por las enzimas o receptores. Así pues, tanto el contenido en apolipoproteínas como el contenido lipídico son factores que determinan la función de las lipoproteínas (Davis & Wagganer, 2005).

Tabla 1-2: Clases de lipoproteínas y apolipoproteínas.

Lipoproteína	Densidad (g/mL)	Diámetro (nm)	Principales apolipoproteínas*	Composición (%)					
				Apo	TG	CE	FC	PL	
CM	<0,94	75-1200	B-48, A-I, A-II, C, E	2	86	3	2	7	
VLDL	0,94-1,006	30-80	B-100, C, E	8	55	12	7	18	
IDL	1,006-1,019	25-35	B-100, E	19	23	29	9	19	
LDL	1,019-1,063	18-25	B-100	22	6	42	8	22	
HDL									
	HDL ₂	1,063-1,125	9-12	A-I, C, E	40	5	17	5	33
	HDL ₃	1,125-1,21	5-9	A-I, A-2, C, E	55	3	13	4	35
Apolipoproteína	Principales funciones								
A-I	Facilita la transferencia de colesterol desde tejidos periféricos a través de ABCA1 Cofactor de LCAT Facilita la captación de lípidos a través de SR-BI								
A-II	Facilita la captación de lípidos a través de SR-BI								
B-48	Componente estructural								
B-100	Facilita la captación de lípidos a través del receptor de LDL								
C-I	Inhibe la actividad de la lipasa hepática Activa la LPL Inhibe la captación mediada por la apolipoproteína E a través de los receptores LDL y LRP								
C-II	Cofactor de la LPL								
C-III	Inhibe la lipasa hepática Inhibe la LPL Podría estimular la actividad de CETP								
E	Facilita la captación de lípidos a través de los receptores LDL y LRP								

Adaptado a partir de Burnett et al. (2002) y Frayn, K.N. (1998)

*Puede existir cierta heterogeneidad en el contenido de apolipoproteínas en base a la división por gradiente, especialmente en las HDL.

Abreviaciones: Apo, apolipoproteína(s); TG, triglicéridos; CE, ésteres de colesterol; FC, colesterol libre; PL, fosfolípidos; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferasa; SR-BI, scavenger receptor class B type I; LDL; lipoproteínas de baja densidad; LPL, lipoproteína lipasa; CETP, proteína transferidora de ésteres de colesterol; LRP, LDL receptor-related protein.

Los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), son las principales lipoproteínas transportadoras de triglicéridos y son sintetizadas en el intestino y en el hígado respectivamente. Tras una breve transición en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), las VLDL son transformadas en LDL más ricas en colesterol. Las HDL son las lipoproteínas con mayor concentración de proteínas y menor cantidad de lípidos, y por gradiente de ultracentrifugación se dividen principalmente en las subfracciones HDL₂ y HDL₃. Se ha descrito que también puede existir una HDL₁, pero no suele encontrarse en cantidades cuantificables (Davis & Wagganer, 2005; Frayn, 1998).

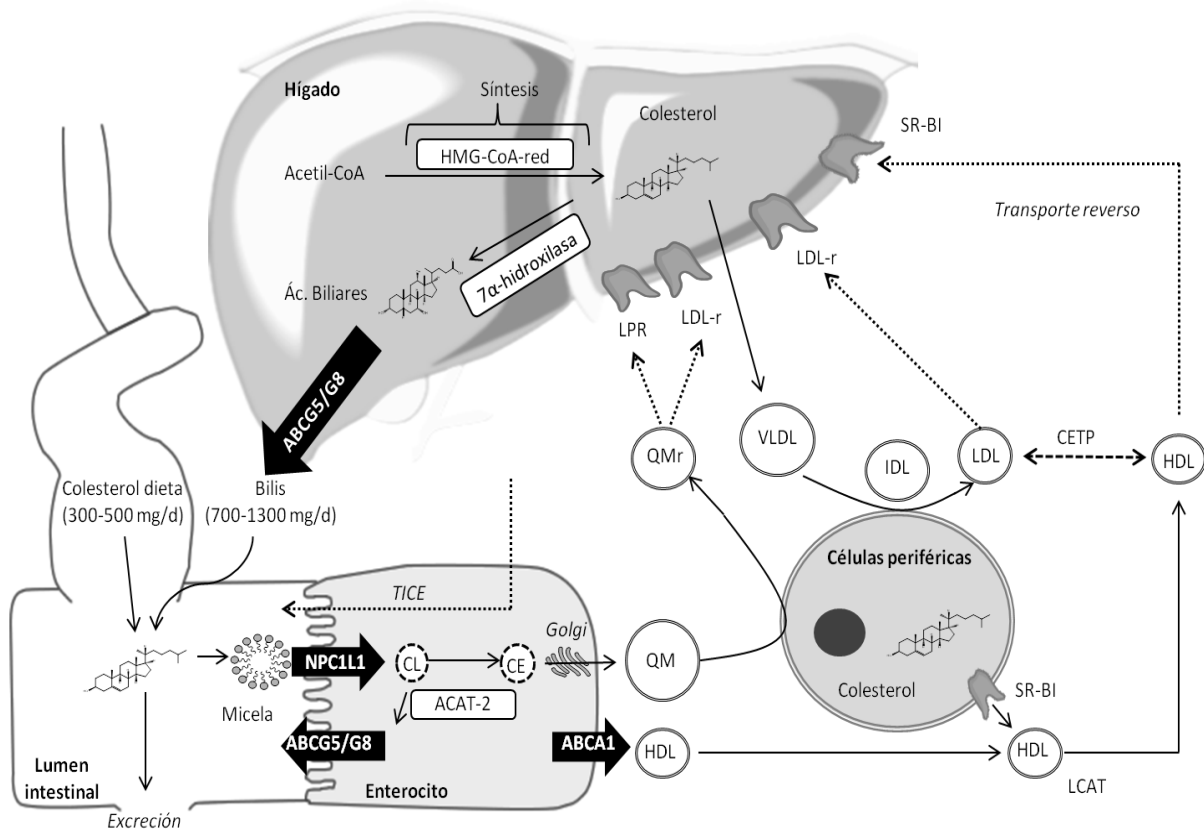
El colesterol de las lipoproteínas puede derivar tanto de la dieta (*vía exógena*) como de la síntesis endógena (*vía endógena*). Estas vías se resumen en la **Figura 1-4**.

1.4.1.1. Vía exógena

La mayor parte del colesterol se absorbe en el duodeno y en el yeyuno proximal. Al tratarse de una molécula insoluble en agua, su absorción intestinal requiere su emulsión gracias a la acción de los ácidos biliares y los fosfolípidos procedentes de la bilis, la hidrólisis de los enlaces éster mediante esterasas pancreáticas específicas (si se trata de colesterol esterificado) y su incorporación en micelas (Lee et al., 2012). La absorción del colesterol en las micelas está mediada de forma activa por el transportador *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) localizado en la membrana de los enterocitos (Davis Jr. & Altmann, 2009; Jia et al., 2011). Una vez internalizado el colesterol es esterificado nuevamente por la enzima *acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase 2* (ACAT-2). El colesterol no esterificado puede ser secretado nuevamente al lumen intestinal a través de los transportadores ABCG5 y ABCG8 (*ATP-binding cassette transporters*) en dirección opuesta al transportador NPC1L1 (Brown & Yu, 2009). Por su parte, los monoglicéridos y los diglicéridos son hidrolizados a AG libres y reesterificados para la formación de triglicéridos. Los ésteres de colesterol y triglicéridos son utilizados junto con las apolipoproteínas y las fosfolípidos

para la síntesis de lipoproteínas, principalmente quilomicrones. Adicionalmente, el colesterol puede ser incorporación a HDL de nueva formación debido a la acción del transportador ABCA1 (Davidson, 2011). Estas lipoproteínas son secretadas a la linfa a través de la membrana basolateral del enterocito y alcanzan la circulación a través de la vena subclavia (Brown & Yu, 2009).

Figura 1-4: Metabolismo del colesterol resumido



Abreviaciones: CM; quilomacrón; CMr, quilomacrón remanente; VLDL, lipoproteína de baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; CL, colesterol libre; CE, colesterol esterificado; NPC1L, transportador Niemann-Pick C1-Like 1; ABC, transportador ATP-binding cassette; LDL-r, receptor de LDL; LPR, LDL receptor-related protein, SR-BI, scavenger receptor class B type I; HMG-CoA-red, 3-hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferasa; CETP, proteína transferidora de ésteres de colesterol; TICE, transintestinal cholesterol efflux.

Los triglicéridos presentes en los quilomicrones pueden ser absorbidos por diferentes tejidos periféricos como el músculo y el tejido adiposo gracias a la acción de la

lipoproteína lipasa (LPL), que permite su hidrólisis a ácidos grasos libres. La pérdida de triglicéridos de los quilomicrones los convierte en lipoproteínas ricas en colesterol, conocidas como quilomicrones remanentes, los cuales son absorbidos por el hígado a través del receptor LDL o bien a través del LRP (*LDL receptor-related protein*) (Davis & Wagganer, 2005; Díaz et al., 2011; Frayn, 1998).

1.4.1.2. Vía endógena

La síntesis endógena de colesterol se produce principalmente en el hígado, pero puede ser sintetizado por cualquier célula nucleada. El colesterol es sintetizado a través de acetyl-CoA en el citoplasma y los microsomas en un proceso que tiene como enzima limitante la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA-red) que cataliza la síntesis de mevalonato a partir de HMG-CoA (Frayn, 1998).

El transporte de colesterol y triglicéridos sintetizados en el hígado tiene lugar a través de las VLDL. De manera similar a los quilomicrones, las VLDL circulan por el flujo sanguíneo donde sus triglicéridos son hidrolizados por la acción de la LPL de los tejidos para la obtención de energía o para su uso en la síntesis de lípidos estructurales, como los fosfolípidos, o compuestos bioactivos, como leucotrienos y tromboxanos. La pérdida progresiva de triglicéridos convierte a las VLDL en IDL que pueden ser reabsorbidas por el hígado o bien convertidas progresivamente en LDL ricas en colesterol. Las partículas de LDL tienen una vida media relativamente larga en circulación (3 días) y aportan colesterol a los tejidos. Las IDL y LDL pueden ser reabsorbidas por el hígado a través de los receptores de LDL gracias a la presencia de apo B-100 (Davis & Wagganer, 2005; Frayn, 1998). La absorción de colesterol procedente de las LDL tanto en el hígado como en las células de los tejidos periféricos, tiene repercusiones importantes en la homeostasis de colesterol. Por una parte, el aumento de colesterol intracelular disminuye la síntesis de colesterol regulada por la HMG-CoA. Por otra, se inhibe la síntesis de nuevos receptores de LDL. Además, incrementa la actividad de ACAT, lo que disminuye la concentración de colesterol libre en el citosol (Frayn, 1998).

1.4.1.3. Transporte reverso del colesterol

Al contrario que las VLDL y las LDL, las lipoproteínas HDL están relacionadas con una disminución del riesgo de padecer aterosclerosis, debido a que son responsables del transporte reverso del colesterol hacia el hígado. Las HDL adquieren lípidos de superficie como colesterol y fosfolípidos de las células de tejidos periféricos. La extracción de colesterol celular se realiza a través de 3 vías: a) una vía conocida como retroendocitosis, no bien conocida hasta la fecha, b) a través de ABCA1 y c) de manera poco específica mediante transporte pasivo a través de receptores SR-BI (*scavenger receptor class B type I*). El colesterol libre puede ser esterificado en las HDL gracias a la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (*lecitin:cholesterol acyl transferase*, LCAT) (Díaz et al., 2011).

El colesterol de las HDL es reabsorbido principalmente por el hígado mediante el receptor SR-BI, que tiene gran afinidad por las apolipoproteínas A1 y A2, y permite la captación de colesterol sin degradar las lipoproteínas. Adicionalmente, las lipoproteínas HDL pueden ser captadas por el hígado de manera similar a las proteínas ricas en triglicéridos gracias la presencia de apolipoproteína E. En la especie humana, existe también otra vía de transporte reverso de colesterol mediada por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), también conocida como *vía indirecta* (Ohashi et al., 2005). La CETP es una proteína de 66-74 kDa que forma un canal de transferencia entre las lipoproteínas que permite el intercambio de ésteres de colesterol desde las HDL a las VLDL y LDL, y de triglicéridos en sentido inverso. La implicación de la CETP en las enfermedades cardiovasculares continúa siendo muy discutida actualmente, ya que se han descrito mecanismos tanto pro- como anti-ateroscleróticos. Por una parte, como resultado del intercambio de lípidos la concentración de HDL puede verse disminuida en detrimento de la de VLDL y LDL. Por el contrario, se piensa que la CETP podría tener efectos beneficiosos, pudiendo reducir la cantidad de ésteres de colesterol en los macrófagos (y por lo tanto los lípidos acumulados en la placa aterosclerótica), disminuir los niveles de LDLox, incrementar la eficiencia de la LCAT y aumentar la captación hepática del colesterol de las HDL (Oliveira & De Faria, 2011; Weber et al., 2010).

Finalmente, una vez transportado al hígado, la principal vía de eliminación de colesterol del organismo se debe a su uso para la síntesis de ácidos biliares a través de una cascada de reacciones que comprende 14 enzimas y que tiene como enzima limitante la colesterol 7 α -hidroxilasa (Gunniss & Gidley, 2010). Estudios recientes sugieren que también se puede producir una secreción activa del colesterol a través de la parte proximal del intestino delgado mediante un proceso cuyo mecanismo molecular es desconocido hasta la fecha y que recibe el nombre en inglés de *transintestinal cholesterol efflux* (TICE) (Van Der Velde et al., 2010).

1.5. COMPOSICIÓN DE LA GRASA Y METABOLISMO LIPÍDICO: EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

En relación a la progresión de patologías como la aterosclerosis, el tipo o calidad de la grasa tiene un papel muy importante, siendo incluso superior al de la cantidad total de grasa presente en la dieta. Por ejemplo, los diferentes tipos de ácidos grasos (AG) que componen la grasa no presentan el mismo efecto sobre el metabolismo de las lipoproteínas, los procesos inflamatorios, la trombosis, el estrés oxidativo y la coagulación de la sangre (Vemuri & Kelley, 2007; Watson, 2009).

1.5.1. Colesterol

El colesterol de la dieta puede incrementar moderadamente las concentraciones en sangre de colesterol total y LDL (Bruckner, 2007). No obstante, se ha visto que también puede aumentar el colesterol HDL, haciendo que se mantenga la relación LDL/HDL (Clifton et al., 1990).

A pesar de que se recomienda reducir su consumo (Aranceta & Pérez-Rodrigo, 2012), sus efectos sobre los niveles plasmáticos de colesterol pueden ser controvertidos (Barona & Fernandez, 2012). Es importante mencionar, que frente a una elevada ingesta de colesterol, no todos los individuos responden de la misma manera. Aproximadamente 2/3 de los individuos no experimentan un incremento de los niveles de colesterol (Barona & Fernandez, 2012). Este hecho puede ser debido a que frente a un elevado consumo de colesterol, el organismo puede reaccionar modulando diferentes mecanismos compensatorios. Por ejemplo, puede promoverse la expresión de transportadores ABCG5/G8, disminuir la actividad de la HMG-CoA-red y favorecer el transporte reverso del colesterol (Boucher et al., 1998; Clifton et al., 1990; Schmitz et al., 2001). En base a esto, en los últimos años algunos autores han cuestionado el impacto real del consumo de colesterol sobre el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Barona & Fernandez, 2012; Harman et al., 2008; Hu et al., 1999).

Tabla 1-3. Resumen de efectos de diferentes ácidos grasos

	Grado de saturación	Ejemplo de ácido graso	Efecto	Mecanismo
Cadena corta	SATURADOS	Acetato	↑ colesterol	↑ Síntesis de colesterol (precursor)
		Propionato	↓ colesterol	↓ Síntesis de colesterol (↓ HMG-CoA-red)
		Butirato	↓ colesterol	↓ Síntesis de colesterol (?) ¹
Cadena larga		Ác. Láurico (C12:0)	↑ colesterol total, LDL y HDL	↑ proporción de colesterol libre en el hígado
		Ác. Mirístico (C14:0)		↓ receptores LDL
		Ác. Palmítico (C16:0)	Efecto neutro / ↓ colesterol	↓ Absorción de colesterol (↓ NPC1L1) (?)
		Ác. Estearico (C18:0)		↑ Aumento de la excreción (?) Rápida conversión a C18:1n-9
	MONOINSATURADOS	Ácido oleico (18:1n-9)	↓ colesterol LDL, ↑ HDL	↓ Proporción de colesterol libre en el hígado ↑ Receptores de LDL ↓ Absorción de colesterol (↓ NPC1L1) (?)
	POLIINSATURADOS (n-6)	Ácido linoleico (C18:2n-6)	↓ colesterol LDL, ↓ HDL	↑ Síntesis ácidos biliares (↑ 7α-hidroxilasa) ↑ Receptores LDL ↓ Absorción de colesterol (↓ NPC1L1) (?)
	POLIINSATURADOS (n-3)	ALA (C18:3n-3) EPA (C20:5n-3) DHA (C22:6n-3)	↓ VLDL, ↓ Triglicéridos	↓ Síntesis de colesterol y triglicéridos (↓ SREBP) ↑ Lipoproteína lipasa (LPL) ↑ Oxidación ácidos grasos ↑ Transporte reverso colesterol
	TRANS	Ácido elaídico (C18:1t-9)	↑ LDL/HDL, ↑ Triglicéridos	(?)

¹ El símbolo (?) denota que el nivel de conocimiento o evidencia del mecanismo correspondiente es bajo o existe cierta controversia.

Abreviaciones: ALA, Ác. α-linolénico; EPA, Ác. Eicosapentaenoico; DHA, Ác. Docosahexaenoico; LDL, lipoproteínas de baja densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; HMG-CoA-red, hidroximetilglutaril-CoA reductasa; NPC1L1, Niemann-Pick C1-Like 1; LPL, lipoproteína lipasa.

1.5.2. Ácidos grasos saturados

El consumo de dietas ricas en ácidos grasos saturados (AGS) (>15% de la energía ingerida) se ha asociado a un aumento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Willett, 2012; Woollett et al., 1992). El consumo de este tipo de AG produce un aumento no sólo de colesterol total, sino también de colesterol LDL y HDL, sin que parezca alterar significativamente la relación LDL/HDL (Mensink et al., 2003).

No obstante, no todos los AGS contribuyen de la misma manera al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, ya que de manera individual presentan efectos muy diferentes (Fernandez et al., 1992; Iggman & Risérus, 2011; Watson, 2009). Los AGS pueden agruparse en función de su longitud de cadena en: ácidos grasos de cadena corta (SCFA, C2:0-C4:0), ácidos grasos de cadena media (C6:0-C10:0) y ácidos grasos de cadena larga (con longitudes de cadena superiores a diez carbonos).

Los AGS de cadena corta, como el acetato (C2:0) o el propionato (C3:0), son absorbidos rápidamente a nivel intestinal por difusión pasiva y transportados directamente al hígado a través de la vena porta (Vogt & Wolever, 2003; Wong et al., 2009). Se piensa que el acetato podría tener un efecto hipercolesterolémico, ya que es uno de los sustratos iniciales de la síntesis de colesterol (Fava et al., 2006; Wolever et al., 1989). De hecho, se ha descrito que una relación acetato/propionato elevada en plasma puede estar relacionada con una mayor concentración de colesterol (Wolever et al., 1996). Por el contrario, el propionato tiene un efecto inhibitor sobre enzimas involucradas en la síntesis endógena de colesterol como la aceil-CoA reductasa, responsable de la síntesis de acetil-Coa a partir de acetato, y sobre todo la HMG-CoA-red (Al-Lahham et al., 2010). El butirato (C4:0) es una fuente de energía importante para las células epiteliales del colon, ya que se calcula que entre el 70-90% es metabolizado por los colonocitos (Wong et al., 2009). Se ha descrito que el butirato puede ser beneficioso para disminuir la incidencia de enfermedades inflamatorias intestinales, así como para la prevención del cáncer de colon (Wong et al., 2006). Por lo que respecta al metabolismo del colesterol, algunos estudios

sugieren que podría reducir los niveles plasmáticos de colesterol (Hara et al., 1999; Nazih et al., 2001), aunque el grado de evidencia es muy inferior al disponible sobre propionato.

Los AGS de cadena media caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) se consideran AG neutros en relación al metabolismo del colesterol, ya que no se acumulan en el hígado debido a que son oxidados rápidamente (Watson, 2009). Adicionalmente, se ha propuesto que el consumo de estos AG puede ser beneficioso para la absorción de algunos minerales y vitaminas liposolubles como el calcio o la vitamina E (Gallo-Torres et al., 1978; Sulkers et al., 1992).

Los ácidos laúrico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) son considerados los principales responsables del aumento de las concentraciones de colesterol en sangre y su efecto podría ser incluso superior al asociado con el consumo de colesterol a través de la dieta (Woollett et al., 1992). Este efecto se atribuye principalmente a un descenso de la captación de colesterol LDL por parte del hígado. La principal hipótesis es que estos AGS podrían interferir en la síntesis de ésteres de colesterol en el hígado, ya que son un mal sustrato de la enzima ACAT responsable de la formación de ésteres de colesterol a partir de colesterol libre y AG (Bruckner, 2007; Fernandez & West, 2005). Se ha descrito que una proporción elevada de colesterol libre reduce la expresión y la actividad de receptores de lipoproteínas LDL, lo que en consecuencia aumenta la cantidad de colesterol en sangre (Dietschy, 1997; Xie et al., 2002).

El ácido esteárico (C18:0) es diferente del resto de AGS de cadena larga, ya que se considera que tiene un efecto neutro sobre los niveles de colesterol y que incluso podría tener un efecto hipocolesterolémico (Schneider et al., 2000b; Watson, 2009). Los mecanismos por los cuales el C18:0 podría regular los niveles de colesterol no son del todo conocidos, pero se ha propuesto que podrían estar relacionados con una disminución de la absorción de colesterol de la dieta y un aumento de la excreción de ácidos biliares y sobre todo de colesterol endógeno (Imaizumi et al., 1993; Schneider et al., 2000b). Adicionalmente, es probable que sus posibles efectos hipocolesterolémicos se deban a su relativamente rápida desaturación y conversión a ácido oleico (AO, C18:1n-9) por acción de la enzima esteroil-CoA desaturasa (SCD1) (Rhee et al., 1997).

1.5.3. Ácidos grasos monoinsaturados

Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) se caracterizan por tener un doble enlace en su estructura. El AGMI más representativo de este grupo de AG es el AO, C18:1n-9, principal AG del aceite de oliva, cuyo consumo se ha relacionado con la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Covas et al., 2009; Lopez et al., 2012; Ruiz-Canela & Martínez-González, 2011).

Numerosos estudios clínicos muestran que dietas constituidas principalmente por aceites ricos en AGMI, especialmente AO, reducen las concentraciones de colesterol total y LDL en sangre y pueden incrementar los niveles de colesterol HDL (Covas et al., 2009; Mensink et al., 2003 ; Watson, 2009). Aunque resulta cuestionable si los efectos beneficiosos de los AGMI son el resultado de la sustitución de los AGS, se han propuesto mecanismos mediante los cuales podrían disminuir directamente la concentración de colesterol en sangre. El efecto del AO sobre los receptores LDL podría ser el contrario al de los AGS, ya que es un buen sustrato para la ACAT, lo que puede aumentar la proporción de colesterol esterificado en detrimento del colesterol libre. En consecuencia, se produciría un aumento de la expresión de receptores de colesterol LDL y se favorecería su captación en el hígado (Bruckner, 2007; Lee & Carr, 2004). Adicionalmente, estudios *in vitro* sugieren que el AO también podría disminuir la absorción de colesterol a nivel intestinal inhibiendo la expresión de proteínas asociadas con su transporte como el transportador NPC1L1 (Chen et al., 2011), aunque existen resultados contradictorios (Alvaro et al., 2010).

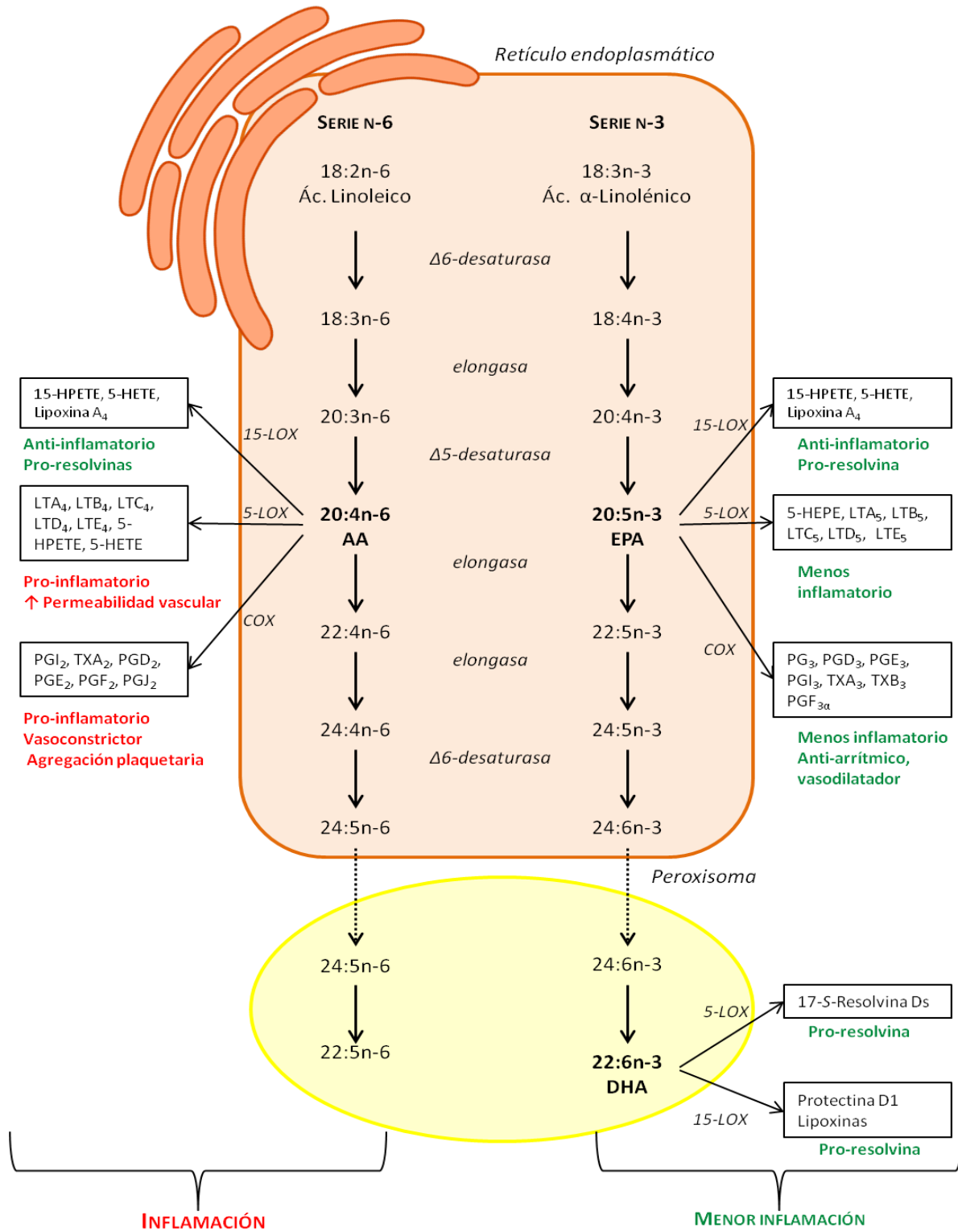
1.5.4. Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son AG con dos o más dobles enlaces en su estructura. Los AGPI se dividen en dos grandes familias: la serie omega-6, o n-6, derivada del ácido graso linoleico (LA, 18:2n-6) y la serie omega-3, o n-3, α -linolénico (ALA, 18:3n-3). Tanto LA como ALA son considerados ácidos grasos esenciales, ya que los mamíferos, incluyendo los humanos, carecen de las enzimas Δ 12- y Δ 15-desaturasa necesarias para su síntesis. Por lo tanto, estos AG sólo pueden ser obtenidos a través de la dieta (Chilton et al., 2008; Das, 2006). Además, estos AG tampoco son interconvertibles en mamíferos, ya

que carecen de la enzima ω -3 desaturasa necesaria para la conversión de LA a ALA (Simopoulos, 2006). Una vez han sido consumidos a través de la dieta, ALA y LA son metabolizados gracias a la acción de diferentes enzimas desaturasas, como la Δ 6 y Δ 5-desaturasa, y elongasas. Estas enzimas son compartidas por las series n-6 y n-3, por lo que existe una competencia a nivel enzimático, pese a que la Δ 6-desaturasa presenta mayor afinidad por ALA que por LA. Las diferentes reacciones de desaturación y elongación tienen lugar en el retículo endoplasmático y dan lugar a la formación de los ácidos grasos 24:5n-6 y 24:6n-3. Estos AG pueden ser translocados a los peroxisomas donde pueden perder dos átomos de carbono por β -oxidación dando lugar a la formación de 22:5n-6 y ácido docosohexanoico (DHA, 22:6n-3), respectivamente (Burdge & Calder, 2005a; Burdge & Calder, 2005b; Das, 2006). No obstante, cabe destacar que la síntesis de AGPI n-3 de cadena larga es poco efectiva en humanos (<1%), especialmente debido a la baja eficiencia de la Δ 6-desaturasa, por lo que generalmente también se recomienda su ingestión a través de la dieta (Arterburn et al., 2006; Burdge & Calder, 2005a; Chilton et al., 2008; Das, 2006).

En base a la evidencia de numerosos estudios los AGPI n-6 y n-3 son considerados beneficiosos para la prevención de las ECV (Erkkila et al., 2008; Harris et al., 2008; Harris et al., 2009; Sala-Vila et al., 2013). Los AGPI n-6 tienen el efecto opuesto a los AGS, ya que cuando se sustituyen de manera isoenergética se produce un descenso de colesterol total y LDL, pero también de colesterol HDL (Harris et al., 2009; Watson, 2009). Su efecto sobre los niveles de colesterol es superior al de los AGMI y AGPI n-3 en relación AGPI n-6 > AGMI > AGPI n-3 (Vemuri & Kelley, 2007). Su consumo aumenta la expresión del receptor hepático LXR α (*Liver X receptor alpha*) que, a su vez, puede inducir la expresión de la 7 α -hidroxilasa, principal enzima responsable de la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol (Fernandez & West, 2005; Kurushima et al., 1995). Adicionalmente, los AGPI n-6 podrían aumentar la expresión de receptores de colesterol LDL a nivel hepático y disminuir la absorción de colesterol a nivel intestinal de manera similar a los AGMI (Alvaro et al., 2010; Fernandez & West, 2005).

Figura 1-5: Biosíntesis de ácidos grasos n-6 y n-3 de cadena larga



Adaptado de Adkins & Kelley (2010), Arterburn et al. (2006), Burdge & Calder (2005a), Das (2006) y Vemuri & Kelley (2007).

Abreviaciones: AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE, ácido hydroxiperoxieicosatetraenoico; LOX, lipoxigenasa; COX, ciclooxigenasa; LT, leucotrieno; PG, prostaglandina; TX, tromboxano.

El consumo de AGPI n-3 se ha asociado principalmente a una disminución de la síntesis de triglicéridos y de la secreción de lipoproteínas VLDL (Bays et al., 2008; Bruckner, 2007; Erkkila et al., 2008). Este efecto es debido a que estos AGPI pueden inhibir la expresión de factores de transcripción SREBP (*sterol regulatory binding protein*), que regulan la expresión de genes involucrados en la síntesis *de novo* de colesterol y triglicéridos (Fernandez & West, 2005; Fukumitsu et al., 2012). Los AGPI n-3 también pueden aumentar la expresión de genes relacionados con la oxidación de AG, principalmente CEPT-1A y leptina (Fukumitsu et al., 2012; Harris et al., 2008). Adicionalmente, se ha descrito que estos AG pueden aumentar la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) y, por lo tanto, favorecer la eliminación de triglicéridos (Fernandez & West, 2005; Harris et al., 2008). Finalmente, otro de los efectos atribuidos a los AGPI n-3, especialmente EPA y DHA, está asociado a su capacidad de favorecer el transporte reverso de colesterol (Harris et al., 2008).

Existe cierta preocupación sobre si el enriquecimiento de las lipoproteínas con AGPI podría aumentar su susceptibilidad a la oxidación (Lapointe et al., 2006). Algunos estudios han demostrado que un mayor consumo de LA puede incrementar la oxidabilidad de las LDL (Abbey et al., 1993; Louheranta et al., 1996; Reaven et al., 1994), pero sin embargo los resultados no son tan claros para los AGPI n-3 (Lapointe et al., 2006; Puiggrós et al., 2002). En consecuencia, resulta recomendable que el consumo de estos AG se acompañe de una ingesta adecuada de antioxidantes.

En la última década, el balance entre AGPI n-6 y n-3 ha cobrado un especial interés debido a que está estrechamente relacionado con la regulación de procesos asociados con la inflamación (Chilton et al., 2008; Simopoulos, 2002). El ácido araquidónico (AA, C20:4n-6) tiene una importante función como precursor para la síntesis de metabolitos bioactivos conocidos como eicosanoides. Más concretamente, es el precursor de prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) de la serie 2, así como de leucotrienos de la serie 4, ácidos

hidroxieicosatetranoicos (HETE) y lipoxinas. A nivel biológico estos metabolitos tienen actividad pro-inflamatoria, pro-trombótica, vasoconstrictora y promueven la agregación plaquetaria (Das, 2006; Simopoulos, 2002). En cambio, el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) sirve como precursor de PG de la serie 3, así como de TX y LT de la serie 5, que son considerados biológicamente menos activos que sus análogos derivados del AA. EPA y DHA también pueden dar origen en mayor medida a la formación de compuestos con actividad anti-inflamatoria conocidos como resolvinas y protectinas (Das, 2006; Serhan et al., 2002). Además, los AGPI n-3 de cadena larga pueden desplazar al AA de las membranas celulares y, en consecuencia, reducir la producción de sus respectivos eicosanoides. Es importante tener en cuenta que los eicosanoides derivados de los AGPI n-6 y n-3 comparten los receptores en las células diana y, por lo tanto, sus efectos pueden ser considerados antagónicos (Das, 2006; Simopoulos, 2002).

Cuando se consumen grandes cantidades de AGPI n-6 se produce una elevada cantidad de eicosanoides pro-inflamatorios lo que contribuye a la formación de trombos y ateromas, siendo un importante factor de riesgo para el desarrollo de patologías como la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares (Chilton et al., 2008; Simopoulos, 1994). No obstante, tales afirmaciones no están libres de controversia (Calder & Deckelbaum, 2011; Fritsche, 2008; Harris et al., 2009). Además, se ha propuesto que un desequilibrio entre los AGPI n-6 y n-3, puede estar asociado a otras patologías como asma, cáncer, enfermedad inflamatoria del intestino, problemas de autoinmunidad, y enfermedades mentales y neurodegenerativas como demencia, esquizofrenia, Alzheimer, Parkinson, etc (Bermejo et al., 2008; Das, 2006; Simopoulos, 2002). En base a esto, resulta recomendable que el cociente n-6/n-3 de la dieta sea de 10-1/1 (Simopoulos, 2002; World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1994). No obstante, en las dietas occidentales actuales se estima que existe una importante deficiencia de AGPI n-3, siendo el cociente n-6/n-3 de 15-20/1 (Simopoulos, 2002; Simopoulos, 2006). Este hecho es principalmente debido a un considerable cambio en las costumbres alimentarias de las sociedades occidentales en el último siglo, lo que ha conllevado un aumento del consumo de aceites de origen vegetal y un descenso del

consumo de pescado (Simopoulos, 2006). En consecuencia, es importante reducir el cociente n-6/n-3 de la dieta, y aumentar el consumo de EPA y DHA (Bays et al., 2008; Calder, 2006; Siddiqui et al., 2004).

1.5.5. Ácidos grasos trans

La mayoría de ácidos grasos insaturados están presentes en la naturaleza en conformación *cis*. No obstante, pueden producirse formas isoméricas *trans* debido a procesos de hidrogenación industrial y de bio-hidrogenación en rumiantes. La producción de este tipo de AG empezó a popularizarse a principios del siglo XX, dado que su conformación permite que sus cadenas puedan compactarse de manera similar a los AGS dando lugar a productos semisólidos, como la margarina. La incorporación de este tipo de productos a la dieta habitual de muchas personas hace que el consumo de este tipo de AG sea frecuente (Vemuri & Kelley, 2007; Watson, 2009).

Un elevado número de estudios epidemiológicos han correlacionado el consumo de ácidos grasos *trans* (AGT), sobre todo de origen industrial, con un aumento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Ganguly & Pierce, 2012; Willett, 2012). De hecho, el meta-análisis de numerosos estudios donde se evalúa el efecto de diferentes grupos de AG revela que los AGT son el macronutriente con efecto más perjudicial sobre el perfil lipídico (Mensink et al., 2003). Su consumo presenta una relación dosis-dependiente con el aumento de la relación LDL/HDL, así como un incremento de la concentración de triglicéridos (Ascherio, 2006).

Además, los AGT presentan otros efectos que pueden incrementar el riesgo cardiovascular, como un aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*) o interleuquina-6 (IL-6) y marcadores de disfunción endotelial como SICAM-1, sVCAM-1 y selectina E (Lapointe et al., 2006).

1.6. PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES A TRAVÉS DE INTERVENCIONES DIETÉTICAS

La magnitud global de las ECV y la obesidad requiere de estrategias y políticas de prevención a través de diferentes niveles. Tales estrategias deben incluir los esfuerzos coordinados de la comunidad internacional, los gobiernos, la industria alimentaria, los medios de comunicación y los centros de salud y educativos (Malik et al., 2013; World Health Organization (WHO), 2003). Para reducir la carga de las ECV y la obesidad, la OMS recomienda realizar actividad física regular, evitar el consumo de tabaco y alcohol, limitar la ingesta energética y consumir una dieta equilibrada (World Health Organization (WHO), 2012a).

En base a lo expuesto en los apartados anteriores, resulta evidente que la composición de la dieta influye de manera directa sobre muchos factores de riesgo asociados a las ECV. Las recomendaciones dietéticas varían entre los diferentes países, pero existe un amplio consenso en torno a la necesidad de disminuir el consumo de alimentos ricos en grasa, azúcares y sal. Debido a que la composición de la grasa influye de manera determinante en la progresión de patologías como la aterosclerosis, en general, se recomienda disminuir el consumo de AGS, AGT y colesterol, y sustituirlos por AGMI y AGPI (Aranceta & Pérez-Rodrigo, 2012).

El fomento del consumo de frutas y verduras es también uno de los principales objetivos de los diferentes programas en materia de nutrición dirigidos a mejorar la salud pública mundial y reducir las enfermedades crónicas. La OMS estima que la ingesta insuficiente de frutas y verduras causa en todo el mundo aproximadamente un 31% de las cardiopatías isquémicas, un 11% de los accidentes cerebrovasculares y un 19% de los cánceres gastrointestinales, siendo uno de los 10 principales factores de riesgo de mortalidad a escala mundial. En base a esto, la OMS recomienda un consumo mínimo de frutas y verduras de 450 g por persona y día (World Health Organization (WHO), 2004). Esto es debido a que las frutas y las verduras son una importante fuente de la mayoría de

micronutrientes esenciales y junto con los cereales y las legumbres la principal fuente de fibra alimentaria de la dieta.

Según diferentes organizaciones, la ingesta de fibra alimentaria recomendada se encuentran entre los 20 y los 40 g por persona y día, y debe consumirse fibra soluble (5-10 g) (Tabla 1-4).

Tabla 1-4: Recomendaciones de consumo de grasa y fibra alimentaria en adultos.

	Internacional OMS ¹	Norteamérica USDA	Europa EFSA	España SENC
Grasa total	15-30%	20-35%	20-35%	≤35%
AGS	<10%	<10% Reemplazarlos por AGMI y AGPI	Lo más bajo posible	≤10%
<i>Trans</i>	<1%	Evitar el consumo de origen industrial	Lo más bajo posible	<1%
Colesterol	<300 mg/d	<300 mg/d <200 mg/d en personas con riesgo cardiovascular o diabetes tipo 2	-	<350 mg/d <110 mg/ 1000 kcal
AGMI	-	-	-	20%
AGPI	6-10%	-	-	5%
n-6	5-8%	5-10%	4 %	5%
n-3	1-2%	-	-	1-2%
EPA + DHA	400-1000 mg/ d 1-2 raciones de pescado/ semana	Incrementar la cantidad y variedad de pescado consumido en sustitución de otras carnes	250 mg	500-1000 mg/ d
Fibra alimentaria	25-30 g/ d	20-40 g/ d	25 g/ d	>25 g/ d

Porcentajes expresados en relación a la energía total ingerida.

Abreviaciones: AGS, Ácidos grasos saturados; AGMI, Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, Ácidos grasos poliinsaturados; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico.

¹Fuentes:

OMS; Organización Mundial de la Salud (World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO), 2003)

USDA; United States Department of Agriculture (U.S. Department of Agriculture (USDA), 2011)

EFSA; European Food Safety Authority (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), 2010)

SENC; Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (Aranceta & Serra Majem, 2011)

La importancia de la presencia de fibra en la dieta se debe a que es necesaria para una correcta función del tracto intestinal y a que presenta numerosos efectos beneficiosos de gran interés en el campo de prevención de la obesidad, la diabetes, las ECV y algunos tipos de cáncer gastrointestinal (Anderson et al., 2009; Elleuch et al., 2011).

1.7. FIBRA ALIMENTARIA

1.7.1. Concepto de fibra alimentaria

El concepto de fibra alimentaria se ha vinculado a diferentes definiciones que han sido motivo de debate científico a lo largo de los años. Se trata de un concepto flexible y de constante evolución en las últimas décadas debido a los avances en el conocimiento analítico, nutricional y fisiológico.

Se considera que E.H Hipsley fue el primero en acuñar el término “fibra alimentaria” en 1953 para incluir componentes de origen vegetal, tales como celulosa, hemicelulosa y lignina (Hipsley, 1953). La posterior aparición entre 1972 y 1976 de nuevas hipótesis que relacionaban la fibra alimentaria con aspectos relativos a la nutrición y la salud dio lugar a una de las definiciones más consistentes hasta el momento:

“La fibra alimentaria se define como la parte remanente de las células vegetales resistente a la hidrólisis (digestión) por parte de los enzimas digestivos humanos” (Trowell, 1974).

En dicha definición, se engloban de manera implícita componentes comestibles y se incluye, por primera vez, un factor fisiológico importante: la indigestibilidad de la fibra en el intestino delgado. Los componentes asociados son principalmente de origen vegetal, tales como la celulosa, hemicelulosas, lignina y sustancias asociadas como ceras, cutina y suberina. En 1976, se incluyeron en la definición todos los polisacáridos indigeribles con efectos fisiológicos, como gomas, celulosas modificadas, oligosacáridos y pectinas (Trowell, 1976).

A partir de este momento, el creciente interés sobre la implicación a nivel fisiológico que pueden tener las fibras alimentarias da lugar a numerosos estudios nutricionales y al desarrollo de nuevas técnicas analíticas de determinación que se ajusten al concepto de fibra alimentaria (Devries et al., 1999). Este hecho facilita la aparición de diferentes definiciones alternativas y en 2001 la American Association of Cereal Chemist (AACC) propone la definición más aceptada hasta la fecha:

“Fibra alimentaria es la parte comestible de plantas o carbohidratos análogos resistentes a la absorción en el intestino delgado y con fermentación parcial o completa en el intestino grueso. Incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas. La fibra alimentaria promueve efectos fisiológicos beneficiosos como la laxación, y/o la atenuación de los niveles sanguíneos de colesterol y/o glucosa” (USA, American Association of Cereal Chemists., 2001)

No obstante, la definición de fibra alimentaria supone hoy en día un debate abierto. En base a métodos puramente analíticos, diferentes compuestos no digeribles podrían ser erróneamente incluidos en el concepto de fibra alimentaria sin tener efectos beneficiosos para la salud. Por otro lado, el potencial de las fibras alimentarias como compuestos con efectos beneficiosos para la salud ha dado lugar a la aparición de nuevos compuestos que actúan como fibras alimentarias pero no quedan incluidos en las definiciones establecidas. En consecuencia, se han propuesto modificaciones alternativas al concepto de fibra que han conllevado la aparición de diferentes definiciones (Food and Nutrition Board., 2005):

Fibra alimentaria: Consistente en carbohidratos no digeribles y lignina existentes de manera intrínseca e intacta en plantas.

Fibra funcional: Consistente en carbohidratos aislados, no digeribles y con efectos fisiológicos beneficiosos para la salud humana.

Fibra total: Suma de *Fibra alimentaria* y *Fibra funcional*.

Estos conceptos, reconocen la diversidad existente de carbohidratos no digeribles y permite la incorporación de nuevas fibras que puedan ser desarrolladas en un futuro. Por ejemplo, incluye además de carbohidratos de origen vegetal, aquellos procedentes de origen animal, así como aquellos carbohidratos que puedan producirse a partir de recursos naturales o por síntesis.

El concepto de fibra funcional engloba aquellas fibras que puedan ser aisladas o extraídas usando procesos químicos o enzimáticos y que tienen efectos fisiológicos beneficiosos. Incluye a su vez, aquellos polisacáridos u oligosacáridos que hayan podido originarse de la modificación de otros existentes, como por ejemplo, por cambios en la longitud del

polímero o en su peso molecular. El principio de inclusión de este concepto reside en el interés de incluir carbohidratos no digeribles de origen animal con beneficios para la salud, como sería el caso de la *n*-acetil-glucosamina (o quitosano).

En resumen, la definición del término “*fibra alimentaria*” ha evolucionado significativamente en las últimas décadas debido a un constante debate internacional que ha sido la base para establecer nuevas metodologías analíticas y profundizar en el conocimiento de sus efectos nutricionales y fisiológicos.

1.7.2. Clasificación y estructura

Las propiedades fisiológicas de la fibra alimentaria dependen en gran medida de sus características físicas, principalmente de su estructura molecular y solubilidad.

Desde el punto de vista estructural, la fibra alimentaria está constituida por la repetición de bloques estructurales básicos. Las fibras alimentarias se dividen en aquellas cuya estructura principal es o no de naturaleza polisacárida. La mayoría de fibras alimentarias están formadas por series de polisacáridos cuyos principales monosacáridos son pentosas como la arabinosa, la xilosa y la apiosa; hexosas como glucosa, galactosa y manosa; 6-deoxihexosas como ramnosa y fucosa, y ácidos urónicos como el ácido glucurónico o el ácido galacturónico (**Figura 1-6**). Ejemplos de fibras pertenecientes a este grupo serían fibras como la celulosa, la quitina, los β -glucanos, la pectina y las gomas guar.

Por lo que respecta a las fibras de naturaleza no polisacárida, sus principales representantes son fibras como la lignina, la suberina, la cutina y ceras relacionadas. La lignina está principalmente formada por cinamil e hidroxicinamil alcoholes, tales como el ρ -cumaril, coniferil o sinapil, mientras que los principales componentes estructurales de la suberina y la cutina son ácidos grasos, alcoholes de ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados y ácidos dicarboxílicos (**Figura 1-7**).

Figura 1-6: Principales monósacaridos contituyentes de fibras alimentarias

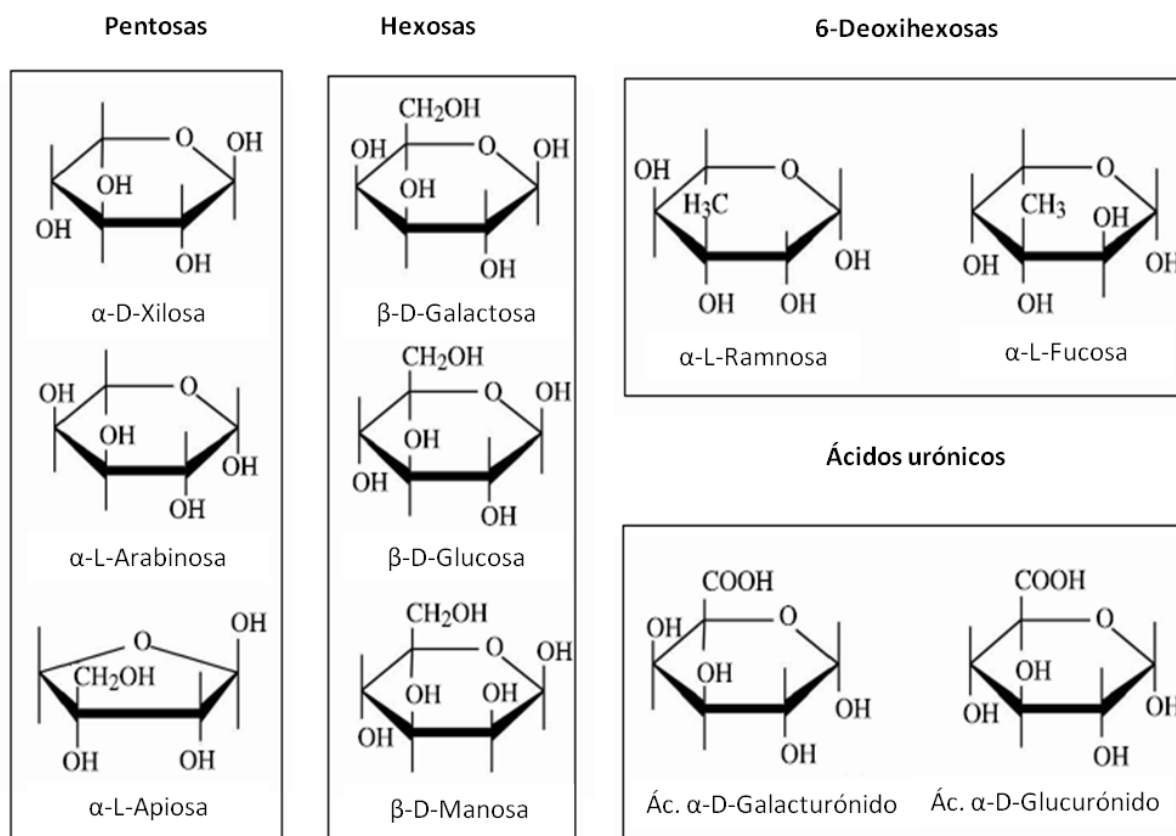
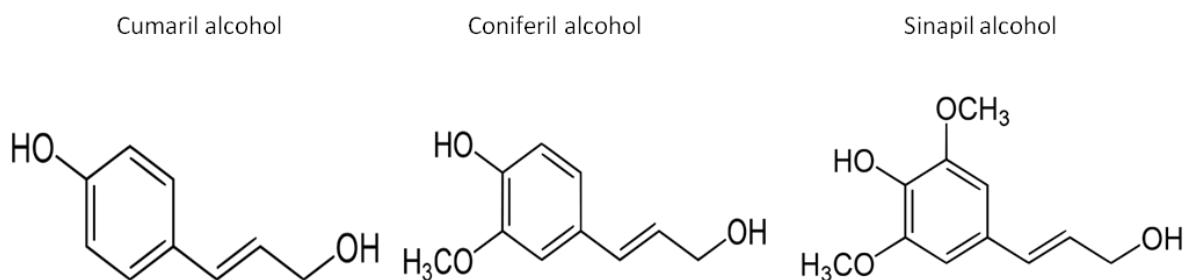


Figura 1-7: Monómeros fenólicos estructurales típicos de la lignina



En función de su solubilidad en agua la fibra alimentaria se divide en dos grandes grupos. Aunque normalmente se entiende como fibra soluble aquella fibra soluble en agua, el término sería extensible a todas aquellas fibras solubles en disoluciones tampón con

enzimas que emulen soluciones enzimáticas propias del sistema digestivo humano. Se incluirían en este grupo polisacáridos como pectinas, gomas y mucílagos presentes en fruta, así como en avena, cebada y legumbres. Las fibras insolubles, estarían principalmente representadas por componentes de la pared de células vegetales como la celulosa, la lignina y la hemicelulosa, así como otros polímeros como el almidón resistente, la quitina y sus derivados.

En la **Tabla 1-5** se resumen algunas de las fibras alimentarias más conocidas y sus fuentes de obtención más comunes.

Tabla 1-5: Clasificación de fibras alimentarias y ejemplos de fuentes de obtención

Estructura		Monómeros	Fuente	
POLISACÁRIDA	SOLUBLE	Hemicelulosas solubles	Glucosa Ác. galacturónico Ácido glucurónico Xilosa	Plantas y partes comestibles
		Pectina	Arabinosa Fructosa, Galactosa Glucosa Ramnosa Xilosa Ác. galacturónico	Manzana Uva Limón Naranjas
		Maltodextrinas resistentes a la digestión	Glucosa	Patata procesada
		β -glucanos	Glucosa	Avena, Salvado, Centeno Pared de hongos y levaduras
		Gomas galactomanano	Manosa Galactosa	Pared células vegetales Gomas guar Algarrobo
		Gomas glucomanano	Manosa Glucosa	Pared células vegetales
		Psyllium	Arabinosa Galactosea Ác. galacturónico Xilosa	Semilla de Psyllium
		Inulina	Fructosa Glucosa	Alcachofa Cebada, Trigo Achicoria Cebolla
		Goma xantana	Glucosa Ramnosa Ác. glucurónico	Bacterias
		Agar	Galactose 3,6-anhydro-L-galactosa Sacáridos sulfonados Xilosa	Algas
NO POLISACÁRIDA	INSOLUBLE	Celulosa	Glucosa	Plantas y partes comestibles
		Hemicelulosa insoluble	Glucosa Ác.galacturónico Ácido glucurónico Xilosa	Plantas y partes comestibles
		Almidón resistente	Glucosa	Banana verde Patata y almidón procesado
		Quitina	Glucosamina	Invertebrados Hongos y levadura
		Lignina	Cinamil alcoholes Sacáridos	Pared de células vegetales
		Cutina	Ácidos grasos Ác. Grasos hidroxilados alifáticos	Pared de células vegetales
		Suberina	Fenoles Hydroxiácidos polifuncionales Ác. dicarboxílicos Otros...	Células vegetales

1.7.3. Fibra alimentaria y enfermedades cardiovasculares

Desde su aparición, el término “fibra alimentaria” se ha relacionado con hipótesis que asociaban un consumo elevado de fibra con efectos beneficiosos para la salud. En 1953, E.H. Hipsey fue el primero en asociar un elevado consumo de vegetales y fibra con una disminución de la incidencia de problemas de salud como la toxemia y la eclampsia. Ocho años más tarde Keys et al. (1961) publicó una de las primeras demostraciones de que el consumo de fibra alimentaria disminuía los niveles de lípidos en sangre. A.R. Walker (1956), H. Trowell (1972 y 1976) y D.P. Burkitt (1977), observaron que enfermedades propias de países industrializados, como las ECV, tenían un bajo índice de prevalencia en poblaciones nativas Africanas cuyo consumo de fibra era muy superior y cuya ingesta de grasa era muy inferior.

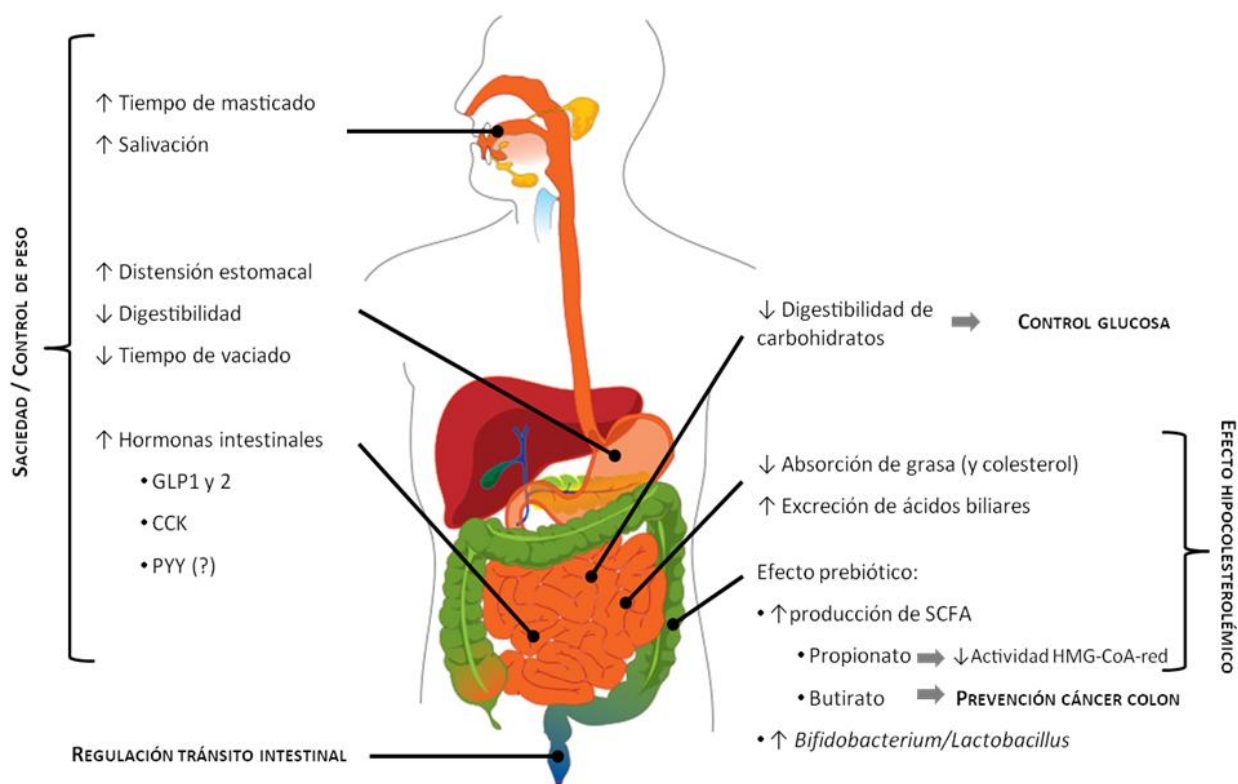
Un gran número de estudios prospectivos y de cohortes han reafirmado tales observaciones en sociedades industrializadas, documentando que un consumo elevado de alimentos ricos en fibra está asociado con una disminución de la prevalencia de ECV (Buil-Cosiales et al., 2009; Kokubo et al., 2011; Wu et al., 2009). No obstante, puede resultar controvertido establecer si existe realmente una causa-efecto directa, debido a la existencia de variaciones en otros factores dietéticos. Por ejemplo, las asociaciones directas entre consumo de fibra y ECV pueden perder peso estadístico teniendo en cuenta que parte del efecto también podría ser atribuido a variaciones en otros factores, como diferencias en el consumo de energía o grasa. Además, resulta difícil concluir si todas las fibras alimentarias tienen un efecto beneficioso frente a ECV, diabetes y obesidad.

Pese a esto, cada vez son más abundantes las evidencias que correlacionan un consumo elevado de fibra con mejoras en factores de riesgo propios de ECV (Anderson et al., 1994). Un elevado consumo de fibra puede tener un efecto beneficioso sobre la hipertensión, la diabetes (Brennan, 2005; Mann, 2001, Sánchez-Muniz, 2012), la obesidad (Howarth et al., 2001; Ludwig et al., 1999a; Slavin, 2008) y el síndrome metabólico (Aleixandre & Miguel, 2008). Es por ello, que el estudio de las fibras alimentarias y su repercusión sobre las ECV, así como diferentes factores de riesgo continúa siendo de gran interés en la actualidad.

1.7.4. Efectos beneficiosos de la fibra alimentaria

El consumo de fibra alimentaria se ha asociado con numerosos efectos beneficiosos (Anderson et al., 2009; Viuda-Martos et al., 2010). Tales efectos varían considerablemente en función de las características físicas y químicas del de la fibra. En términos generales, se considera que la solubilidad de las fibras en agua puede condicionar sus efectos beneficiosos. Los efectos de las fibras solubles, también pueden depender de si se trata de fibras viscosas (p.ej. goma guar) o no viscosas (p.e. maltodextrina resistente a la digestión) en función de su capacidad de formar geles, o de si se trata de fibras fermentables (p.e. inulina) o no fermentables (p.ej. psyllium) en base a si pueden ser degradadas por la microbiota intestinal (Chutkan et al., 2012). Tradicionalmente, los efectos de las fibras alimentarias se han agrupado en base a estas características. No obstante, cabe destacar que se trata de una clasificación simplista, ya que las propiedades beneficiosas de las fibras no son exclusivas del tipo de fibra y además muchas fibras, tal y como se encuentran de manera natural en los alimentos, no son exclusivamente solubles o insolubles sino que son una mezcla de ambos tipos. Algunos de los efectos beneficiosos del consumo de fibra alimentaria se resumen en la **Figura 1-8** y son descritos a continuación. Entre los efectos fisiológicos atribuibles al consumo de fibra alimentaria que pueden resultar de interés debido a su relación con la prevención de factores de riesgo asociados a ECV destacan efectos beneficiosos relacionados con el control de peso y la glucemia, y, sobre todo, efectos hipocolesterolémicos.

Figura 1-8: Resumen de efectos beneficiosos del consumo de fibras alimentarias



Resumen general de algunos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de fibras alimentarias (solubles e insolubles).

Abreviaciones: GLP, glucagon-like peptide; CCK, colecistoquinina; SCFA, ácidos grasos de cadena corta.

1.7.4.1. Fibra alimentaria y control de peso

Diferentes estudios sugieren que un elevado consumo de fibra, bien sea en forma de alimentos ricos en fibra o en forma de complementos alimenticios, puede relacionarse con un menor consumo de energía y, en último término, con una mayor pérdida de peso o una menor ganancia de peso (Howarth et al., 2001; Keithley & Swanson, 2005; Ludwig et al., 1999a). De hecho, el consumo de fibra alimentaria está inversamente asociado con el peso y la grasa corporal (Slavin, 2005).

Los posibles beneficios de la fibra alimentaria sobre el consumo de peso se atribuyen a diferentes efectos que pueden influir sobre la energía ingerida. En primer lugar, la incorporación de fibra alimentaria en alimentos puede diluir la energía presente en los mismos. Es decir, la sustitución de otros nutrientes por fibra alimentaria, la cual es de

naturaleza indigerible, supone una reducción de la densidad energética de los alimentos, de manera que a una misma cantidad de alimento consumido se ingiere una menor cantidad de energía (Pérez-Escamilla et al., 2012).

El consumo de fibra alimentaria puede incrementar la sensación de saciedad. En general, la palatabilidad de los alimentos ricos en fibra hace que se requiera un mayor esfuerzo o tiempo de masticado, lo que puede promover el efecto de saciado y reducir la cantidad de alimento ingerido (Slavin, 2005). A su vez, una mayor masticación puede promover una mayor distensión estomacal debido al aumento de la producción de saliva y ácidos gástricos. La capacidad de algunas fibras alimentarias de retener agua puede intensificar este efecto (Howarth et al., 2001).

Uno de los efectos más estudiados de la fibra alimentaria consiste en su capacidad de disminuir la digestibilidad de los nutrientes presente en los alimentos y, por lo tanto, la energía procedente de los mismos, especialmente en forma de grasa. Este efecto se atribuye principalmente a fibras viscosas, debido a su capacidad de formar una matriz donde pueden quedar atrapados los nutrientes, lo que puede retrasar su digestión y disminuir el contacto físico entre los nutrientes y la pared intestinal, necesaria para su absorción (Adlercreutz, 2007; Jenkins, 2004; Keithley & Swanson, 2005). No obstante, este efecto también es atribuible a otros tipos de fibra que independientemente de su viscosidad presenten capacidad de unir o capturar grasas (capacidad *fat-binding*), disminuir la acción de enzimas digestivas o actuar sobre cualquier otro aspecto del proceso digestivo (p. ej. dificultar la emulsión de grasa a nivel intestinal) (Adlercreutz, 2007; Gallaher et al., 2000; Yokoyama et al., 2011). Además, en base a algunas hipótesis relacionadas con la regulación energética, se piensa que un aumento del tiempo durante el cual los nutrientes son absorbidos puede reducir la sensación de hambre y aumentar la de saciedad (Friedman, 1995; Stubbs & Tolcamp, 2006).

Algunas teorías más especulativas proponen que las fibras alimentarias también podrían influir sobre la ingesta de energía a través de efectos relacionados con hormonas asociadas al tracto intestinal. Por ejemplo, se piensa que el consumo de fibras

alimentarias podría aumentar la producción de péptidos derivados del proglucagón como el GLP-1 y 2 (*glucagon-like peptide*) secretados por las células L distribuidas a lo largo del intestino (Aleixandre & Miguel, 2008). Se sabe que la secreción de estas hormonas aumenta en respuesta a la cantidad de macronutrientes presentes en el intestino, tales como grasas e hidratos de carbono. Debido a que las células productoras de proglucagón se encuentran principalmente en el íleon y el colon, se cree que el efecto de la fibra alimentaria podría deberse tanto a un aumento de la concentración de macronutrientes en el íleon como a una mayor producción de SCFA en el colon. Entre los diferentes efectos de la GLP-1 y 2 a nivel fisiológico se incluyen una reducción de la secreción de jugos gástricos y del vaciado estomacal, así como una disminución de la sensación de hambre (Howarth et al., 2001). Efectos similares se han observado en otras hormonas como la colecistoquinina (CCK), un neurotransmisor secretado por células del tracto intestinal superior y que regula la motilidad intestinal, la contracción de la vesícula biliar y la secreción de enzimas pancreáticas (Slavin, 2005). Finalmente, se sabe que las células L también son productoras de péptido PYY, el cual reduce el apetito y la ingesta de alimento, aunque hasta el momento se desconoce si su producción es alterada de manera significativa por el consumo de fibras alimentarias (Aleixandre & Miguel, 2008).

1.7.4.2. Fibra alimentaria y control de glucosa

Durante el proceso de digestión, los carbohidratos complejos, como por ejemplo, el almidón, son hidrolizados a sus respectivos monosacáridos. Aunque la mayoría de monosacáridos tienen funciones nutricionales, la glucosa y su metabolismo suele recibir mayor atención en lo que respecta a la diabetes y la obesidad (Brennan, 2005).

La fibra alimentaria puede retrasar la degradación de los carbohidratos complejos y reducir la absorción de glucosa. Esta propiedad se atribuye comúnmente a la capacidad de algunas fibras de aumentar la viscosidad en el intestino (Brennan, 2005). Sin embargo, la fibra alimentaria también altera la estructura de los alimentos, lo que puede dificultar la accesibilidad de los carbohidratos complejos a enzimas digestivas como la amilasa. Estudios *in vitro* demuestran que el enriquecimiento de alimentos con fibras tanto

solubles como insolubles disminuye y/o retrasa la degradación del almidón por efecto de la amilasa. La reducción de la liberación de glucosa supone una reducción del índice glucémico de los alimentos (Tudorică et al., 2002; Wakabayashi et al., 1999). Otro de los mecanismos relacionados con los efectos beneficiosos de las fibras alimentarias sobre el metabolismo de la glucosa se asocia a su capacidad de aumentar la secreción de GLP-1, que tiene efectos insulínotropicos, es decir, mejora la producción y la respuesta a la insulina (Prieto et al., 2006).

Diferentes estudios demuestran que el consumo de fibras, especialmente fibras solubles viscosas, atenúa los niveles de glucosa postprandial y la respuesta de insulina en pacientes sanos (Alminger & Eklund-Jonsson, 2008). Además, existen evidencias que demuestran que tanto el consumo de alimentos con un bajo índice glucémico como la suplementación de la dieta con fibra alimentaria mejora el metabolismo de la glucosa y la insulina en pacientes con diabetes Tipo 1 y 2 (Brennan, 2005; Mann, 2001; Tapola et al., 2005).

Cabe destacar que el consumo continuado de alimentos con un elevado índice glucémico conlleva una serie de efectos metabólicos adversos que estimulan el hambre, promueven la deposición de grasa e incrementa el estrés de las células β del páncreas (Gaesser, 2007; Pawlak et al., 2004). Por lo tanto, resulta aconsejable un cambio de hábitos alimentarios que conlleve un mayor consumo de fibra alimentaria y de alimentos con un bajo índice glucémico para prevenir y tratar el síndrome metabólico y la aparición de patologías asociadas como la diabetes y las ECV (Aleixandre & Miguel, 2008). De hecho, estudios clínicos muestran que existe un mayor riesgo de infarto de miocardio en aquellas personas que consumen dietas con un elevado índice glucémico en comparación a aquellas que consumen habitualmente dietas con un bajo índice (Ludwig et al., 1999b).

1.7.4.3. Fibra alimentaria y control de colesterol

La capacidad de reducir los niveles de colesterol en sangre es una característica que se atribuye principalmente, pero no de manera excluyente, a fibras solubles. Diferentes estudios demuestran que un elevado consumo de fibra soluble está asociado con una reducción de los niveles de colesterol en sangre (Brown et al., 1999; Solà et al., 2010;

Wärnberg et al., 2009; Wolever et al., 2011). Generalmente, estos estudios muestran una reducción de los niveles de colesterol total y LDL, sin que se produzcan cambios significativos en los niveles de lipoproteínas HDL. Entre las diferentes fibras solubles cuya capacidad hipocolesterolémica está documentada con un grado de evidencia considerable se incluyen fibras como galactomananos (goma guar), glucomananos, β -glucanos, pectinas, psyllium y gomas xantanas. Por el contrario, se ha demostrado que fibras insolubles como la celulosa no tienen efecto sobre los niveles de colesterol (Jalili et al., 2000). No obstante, cabe destacar que no todas las fibras solubles e insolubles tienen el mismo efecto sobre los niveles de colesterol ni presentan los mismos mecanismos. Por ejemplo, fibras funcionales insolubles como el quitosano han demostrado ser efectivas reduciendo los niveles de colesterol (Aranaz et al., 2009).

Existen diferentes mecanismos por los cuales las fibras alimentarias pueden reducir los niveles de colesterol. Principalmente, estos mecanismos están asociados con una disminución de la absorción de colesterol, un aumento de la excreción de ácidos biliares y una reducción de la síntesis endógena de colesterol.

Efecto sobre la absorción de colesterol y la excreción de ácidos biliares

Uno de los principales mecanismos asociados a la capacidad de las fibras de reducir los niveles de colesterol en plasma está relacionado con su capacidad de reducir la absorción de colesterol de la dieta y aumentar la excreción de ácidos biliares (Gunness & Gidley, 2010, Viuda-Martos et al., 2010). Este mecanismo se ha atribuido sobre todo a fibras solubles con capacidad de formar geles y aumentar la viscosidad a nivel intestinal (Moriceau et al., 2000; Theuwissen & Mensink, 2008). Sin embargo, algunos estudios demuestran que no es estrictamente necesario que haya un aumento de la viscosidad para que se produzca un aumento de la excreción de colesterol y ácidos biliares (Bangoura et al., 2009; Gallaher et al., 1993b).

Determinadas fibras pueden reducir de manera directa la absorción de colesterol de la dieta (Gallaher et al., 2002). No obstante, debido a que el colesterol exógeno sólo representa aproximadamente de un cuarto a un tercio del colesterol total en el

organismo, el principal efecto hipocolesterolémico de las fibras alimentarias se atribuye a su capacidad de aumentar la excreción de ácidos biliares (Gunnness & Gidley, 2010; Liu et al., 2008). Algunas fibras pueden unirse o atrapar ácidos biliares en el tracto intestinal lo que dificulta la formación de micelas y por lo tanto la absorción de colesterol y la reabsorción de ácidos biliares, y en consecuencia aumenta su excreción (Gallaher et al., 2000; Kishimoto et al., 1995). Generalmente, los ácidos biliares son secretados al lumen intestinal y reabsorbidos en el intestino delgado para poder ser utilizados nuevamente para emulsionar la grasa y facilitar su absorción. La interrupción de la circulación enterohepática de los ácidos biliares conlleva que una mayor parte de colesterol hepático deba destinarse a la producción de ácidos biliares para su reemplazo en lugar de ser incorporados al torrente sanguíneo en forma de VLDL (Chiang, 2009). Aunque la actividad enzimática de la HMG-CoA-red puede aumentar para suplir las necesidades de colesterol, la síntesis *de novo* de colesterol puede no ser suficiente para suplir las necesidades de reemplazo de ácidos biliares. En consecuencia, el aumento de la demanda de colesterol en el hígado conlleva un aumento de la síntesis y la actividad de receptores de LDL, lo que aumenta la captación de lipoproteínas VLDL y LDL, disminuyendo así su concentración en sangre (Chiang, 2009; Gunnness & Gidley, 2010).

Inhibición de la síntesis de colesterol

Las fibras no digeridas y absorbidas en el intestino delgado pueden ser usadas como sustrato para la actividad fermentativa de bacterias anaeróbeas en el ciego y el colón. Como resultado se observa un aumento de SCFA tales como el acetato, el propionato y el butirato (Kishimoto et al., 1995; Pylkas et al., 2005; Wong et al., 2009). Los SCFA, particularmente el propionato, puede reducir la síntesis de colesterol a través de la disminución de la actividad de enzimas como la acetil-CoA reductasa y la HMG-CoA-red (*Véase apartado 1.5.2. Ácidos grasos saturados*).

El papel de algunas fibras sobre la regulación de los niveles de glucosa también podría afectar a la síntesis de colesterol. La insulina es conocida por su influencia sobre el metabolismo de los carbohidratos, la síntesis de proteínas y la lipogénesis. Adicionalmente, esta hormona activa la enzima HMG-CoA-red (Lakshmanan et al., 1973).

Un descenso de la glucosa postprandial se acompaña de una reducción de los niveles de insulina, lo que potencialmente podría reducir la actividad de la HMG-CoA-red y en consecuencia la síntesis hepática de colesterol (Gunness & Gidley, 2010). No obstante, debido a que la insulina interviene en muchas de las respuestas inducidas por la dieta resulta difícil diseñar experimentos que demuestren claramente esta teoría.

1.7.4.4. Otros efectos beneficiosos

Uno de los beneficios más conocidos de la fibra alimentaria se asocia a su capacidad de mejorar la salud del tracto intestinal. Las fibras insolubles, pese a no tener capacidad de retener agua, incrementan el peso del bolo fecal y aumentan el tránsito intestinal mediante una estimulación mecánica de la mucosa del intestino y un aumento del peristaltismo (Cummings, 2001; Chen et al., 1998). Este hecho hace que las fibras insolubles sean de utilidad en personas con problemas de estreñimiento, un problema muy común en personas con obesidad (Aleixandre & Miguel, 2008). Las fibras solubles con capacidad de retener agua favorecen la formación de un bolo fecal más blando que paradójicamente disminuye la consistencia en personas con estreñimiento y normaliza la consistencia en personas con diarrea (Chawla & Patil, 2010; Chutkan et al., 2012).

La capacidad fermentativa de algunos tipos de fibra conlleva también una mejora de la salud intestinal. Su efecto prebiótico mejora la ecología de la microbiota del intestino, aumentando la cantidad y la diversidad de bacterias acidolácticas no patógenas como *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus* sp. (Fastinger et al., 2008; Velázquez et al., 2000). Además, un aumento de la actividad fermentativa puede disminuir el pH del intestino e inhibir el crecimiento de otros microorganismos patógenos (Lim et al., 2005; Wong et al., 2009). Además de los beneficios inherentes sobre la salud intestinal, el efecto de la fibra alimentaria sobre la composición de la microbiota intestinal puede resultar de interés en la prevención o el tratamiento de la obesidad y la diabetes. Esto es debido a que algunos estudios muestran que la diversidad bacteriana en el intestino es diferente en personas que presentan obesidad. Además, algunas publicaciones recientes sugieren que la microbiota intestinal puede tener un papel importante tanto en la obtención de energía

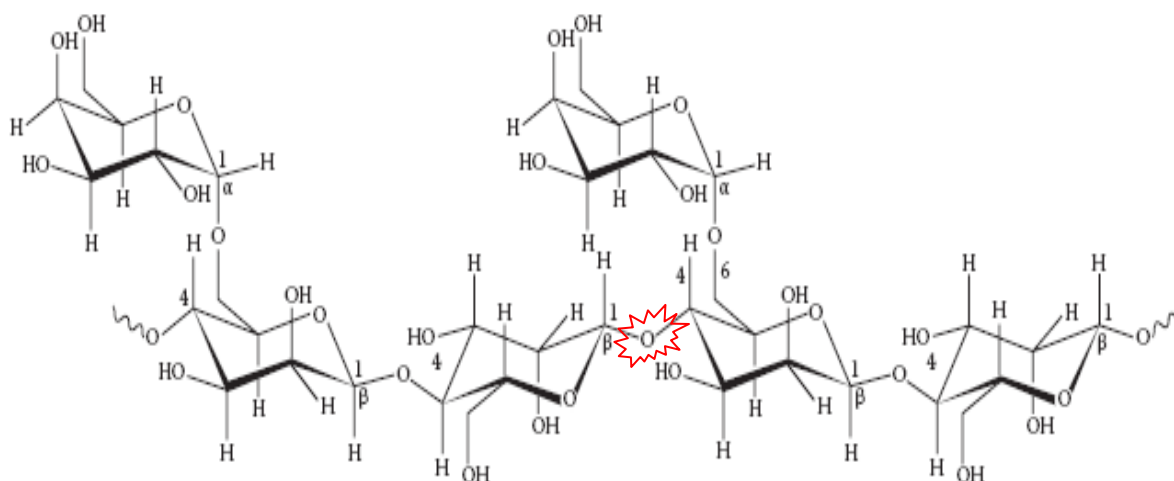
como en la regulación del metabolismo (Ajslev et al., 2011; Burcelin et al., 2011; Luoto et al., 2011).

En los últimos años, uno de los efectos beneficiosos del consumo de fibra que mayor interés ha despertado está relacionado con su posible papel en la prevención del cáncer de colon (Rose et al., 2007). Las fibras alimentarias pueden presentar un efecto quimioprotector, por ejemplo, disminuyendo la exposición a toxinas debido a un aumento del tránsito intestinal y adsorbiendo metabolitos tóxicos de origen exógeno, endógeno y/o bacteriano (Lim et al., 2005; Scharlau et al., 2009). Adicionalmente, el butirato que se produce como consecuencia de una mayor actividad fermentativa puede aumentar la actividad de enzimas como glutatión-S-transferasas, involucradas en la detoxificación de carcinógenos tanto de origen endógeno como exógeno (Scharlau et al., 2009). Por último, existen estudios que sugieren que el consumo de fibra puede inducir efectos moduladores de procesos inflamatorios e inmunes, que son de interés tanto por la implicación de estos procesos en la evolución del cáncer de colon, como a su relación con muchos otros aspectos fisiológicos (Lim et al., 2005; Murphy et al., 2010).

1.7.5. Goma guar parcialmente hidrolizada

La goma guar (GG) es una fibra soluble obtenida a partir de la planta leguminosa *Cyamopsis tetragonolobus* L. originaria de Sudáfrica, Australia, Estados Unidos y sobre todo Asia, especialmente de la India y Pakistan (Kapoor & Juneja, 2009; Peter et al., 2001). Se trata de un polímero de elevado peso molecular que estructuralmente está formado por galactomananos, consistentes en una esqueleto lineal de unidades D-manopiranosil unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, y unidades de α -D-galactopiranosas unidas en posición O-6 aproximadamente cada dos manopiranosas del esqueleto principal (**Figura 1-9**). Generalmente, la relación manosa:galactosa es aproximadamente 62:38 (McCleary & Prosky, 2001; Peter et al., 2001). Su uso más común en la industria alimentaria es el de espesante, gelificante y estabilizante en un elevado número de productos como zumos, salsas y productos lácteos, entre otros. Debido a sus efectos beneficiosos para la salud es considerada una de las fibras solubles más prometedoras (Butt et al., 2007; Peter et al., 2001). Sin embargo, su elevada viscosidad puede dificultar su incorporación a los alimentos con finalidades nutraceúticas en concentraciones fisiológicamente activas.

Figura 1-9: Estructura química de la goma guar



La unión de galactopiranosas se produce cada dos unidades de manopiranosas. La hidrólisis enzimática para la obtención de goma guar parcialmente hidrolizada se produce entre unidades de manopiranosas.

La goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG) se obtiene mediante la hidrólisis enzimática controlada de la goma guar. El proceso se realiza generalmente con enzimas *endo-β-D-manasa* procedentes de *Aspergillus niger*, lo que permite la obtención de compuestos con un grado de polimerización aproximadamente 10 veces inferior a la goma guar (Kapoor & Juneja, 2009). El producto final obtenido consiste en un polvo blanco que presenta una viscosidad baja en solución acuosa. Así, por ejemplo, mientras que la goma guar puede presentar una viscosidad de entre 2000-3000 mPa·s en solución acuosa al 1%, la viscosidad de la PHGG obtenida por métodos enzimáticos puede ser de aproximadamente 12 mPa·s (McCleary & Prosky, 2001). Un ejemplo de PHGG obtenidas mediante este proceso son los productos actualmente comercializados con los nombres de Benefiber® y Sunfiber®. Alternativamente, la PHGG puede obtenerse por procesos químicos.

Pese a la significativa reducción de la viscosidad de la PHGG, ésta conserva diferentes funciones beneficiosas típicamente atribuidas a la GG. Diferentes estudios en animales de laboratorio y en humanos muestran que la PHGG presenta efectos hipolipidémicos, pudiendo disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma, así como efectos hipoglucémicos, reduciendo los niveles de glucosa e insulina postprandial (Minekus et al., 2005; Takahashi et al., 2009; Yoon et al., 2008a). Además, se ha descrito que la PHGG puede tener diferentes efectos beneficiosos en el tracto digestivo. Su consumo puede incrementar la frecuencia de defecación, aumentar el bolo fecal y disminuir su consistencia, siendo de utilidad en personas con estreñimiento (Giannini et al., 2006; Takahashi et al., 1994). Adicionalmente, sus beneficios sobre el tracto digestivo pueden ser de utilidad en aplicaciones de interés clínico. Por ejemplo, en pacientes que requieren una alimentación enteral continuada, una de las principales complicaciones es la aparición de problemas gastrointestinales, especialmente diarreas. La diarrea es la principal causa por la cual la alimentación enteral es suspendida debido a la elevada pérdida de fluidos y balance electrolítico, así como al empeoramiento del estado nutricional. En este tipo de pacientes la adición de PHGG a la dieta líquida puede aumentar la tolerancia gastrointestinal y el control intestinal (Spapen et al., 2001). Por el contrario, la elevada

viscosidad de la goma guar limita su uso en este tipo de fórmulas debido a su administración por sonda nasogástrica.

La PHGG, debido a que no es digerida por las enzimas digestivas en humanos, puede alcanzar el intestino grueso donde puede ser degradado por enzimas glicolíticas de los microorganismos, siendo utilizado como sustrato energético para su crecimiento. Diferentes estudios demuestran que su consumo mejora la microbiota intestinal incrementando el número y la diversidad de bifidobacterias y lactobacilos. El aumento de este tipo de microorganismos y su actividad conlleva una mayor producción de SCFA y un descenso del pH intestinal (Okubo et al., 1994; Pylkas et al., 2005). Por el contrario, algunos estudios sugieren que la PHGG podría reducir el número de microorganismos patógenos en el intestino, como por ejemplo *Salmonella* sp. o *Colstridium* sp (Linetzky Waitzberg et al., 2012; McCleary & Prosky, 2001). Este hecho hace que la PHGG sea considerada de gran interés para el tratamiento de problemas intestinales de etiología poco conocida en los que se cree que la disbiosis tiene un papel importante, como el síndrome del intestino irritable (Giannini et al., 2006; Parisi et al., 2002).

En consecuencia, la PHGG es una fibra con un gran potencial para la industria alimentaria debido a la posibilidad de ser incorporada a una amplia variedad de matrices alimentarias y a que presenta un elevado número de efectos fisiológicos beneficiosos. No obstante, a diferencia de la goma guar, que ha sido más estudiada, muchos de los mecanismos mediante los cuales la PHGG ejerce sus efectos beneficiosos no son bien conocidos.

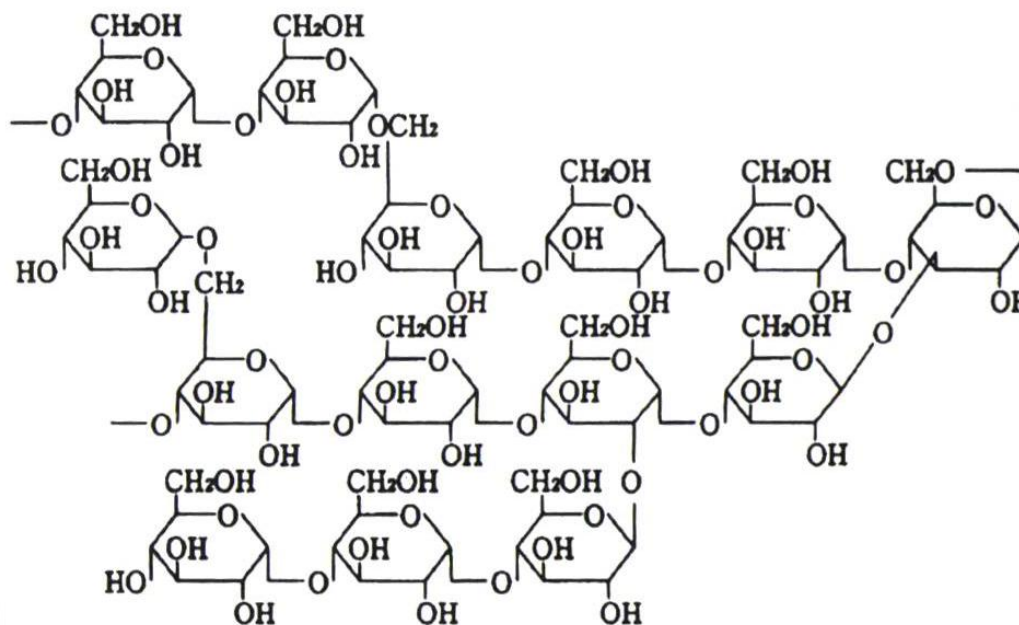
1.7.6. Maltodextrina resistente a la digestión

El almidón es una de las principales fuentes de hidratos de carbono en la dieta debido a su elevada abundancia en las plantas. Se ha observado que una parte de los almidones resiste a la digestión enzimática. Esta fracción ha recibido el nombre de *almidón resistente a la digestión* y el estudio de sus propiedades beneficiosas ha despertado un gran interés, ya que presenta propiedades fisiológicas típicas de la fibra alimentaria (Englyst & Cummings, 1987; Fuentes-Zaragoza et al., 2010). En los hidrolizados de almidón, también existen componentes indigeribles como las dextrinas y las maltodextrinas. La

maltodextrina resistente a la digestión (MD) resulta de gran interés por sus propiedades físicas y por su idoneidad para ser utilizada en diferentes alimentos (McCleary & Prosky, 2001).

Un ejemplo concreto de maltodextrina resistente a la digestión comercializado actualmente es el Fibersol-2[®]. Esta maltodextrina se obtiene a partir de almidón de maíz mediante un proceso que comprende: a) una primera hidrólisis con calor y una concentración baja de ácido clorhídrico en condiciones de baja humedad, b) una segunda hidrólisis con amilasa, c) un proceso de refinado y pulverizado mediante *spray-drying* (Ohkuma et al., 1997). Como resultado se obtiene un compuesto con un peso molecular aproximado de 2000 Da que a diferencia del almidón, que sólo contiene enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$, también contiene enlaces $1\rightarrow2$ y $1\rightarrow3$.

Figura 1-10: Estructura de la maltodextrina resistente a la digestión



Ejemplo de estructura aproximada de Fibersol-2.

Las propiedades físicas de este compuesto permiten que sea incluso más soluble en agua que la maltodextrina convencional, pero sólo parcialmente digerible por el sistema

digestivo humano. Aproximadamente el 90% del compuesto es indigerible tal y como se entiende en el concepto de fibra alimentaria. Este hecho hace que sea de gran interés para la industria alimentaria, ya que además de presentar propiedades beneficiosas para la salud, propias de la fibra soluble, puede ser incorporado a una gran variedad de alimentos sin modificar significativamente sus propiedades organolépticas (McCleary & Prosky, 2001).

Las principales propiedades nutraceuticas de la MD incluyen efectos sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, así como otros efectos fisiológicos beneficiosos sobre el tracto intestinal (McCleary & Prosky, 2001). Diferentes estudios muestran que la coadministración de MD retrasa la absorción de glucosa, atenuando la curva de glucosa e insulina postprandial en sangre. A diferencia de otras fibras solubles de naturaleza más viscosa, como la pectina o la goma guar, se cree que este efecto podría ser debido a un efecto reversible de bloqueo competitivo de los transportadores asociados a disacáridos (Wakabayashi et al., 1999). Adicionalmente, estudios clínicos muestran que su consumo también puede disminuir los niveles de triglicéridos y colesterol, especialmente LDL (Kishimoto et al., 2009; Nagata & Saito, 2006; Sato et al., 2009), lo que hace que esta fibra sea de gran interés para la prevención de patologías como la obesidad. De hecho, estudios en animales sugieren que podría disminuir la acumulación de grasa en el tejido adiposo (McCleary & Prosky, 2001).

Al tratarse de una fibra no digerible, aproximadamente el 90% de la fibra alcanza el intestino grueso, donde puede ser metabolizada por la microbiota intestinal (aproximadamente el 40% de la fibra no utilizada es excretada). Este hecho ha sido confirmado en estudios *in vitro* donde se demuestra un aumento de la producción de SCFA, especialmente propionato, como resultado de su fermentación. De manera similar, estudios clínicos muestran que la MD puede aumentar la proporción de bifidobacterias en el tracto intestinal (Fastinger et al., 2008; Flickinger et al., 2000).

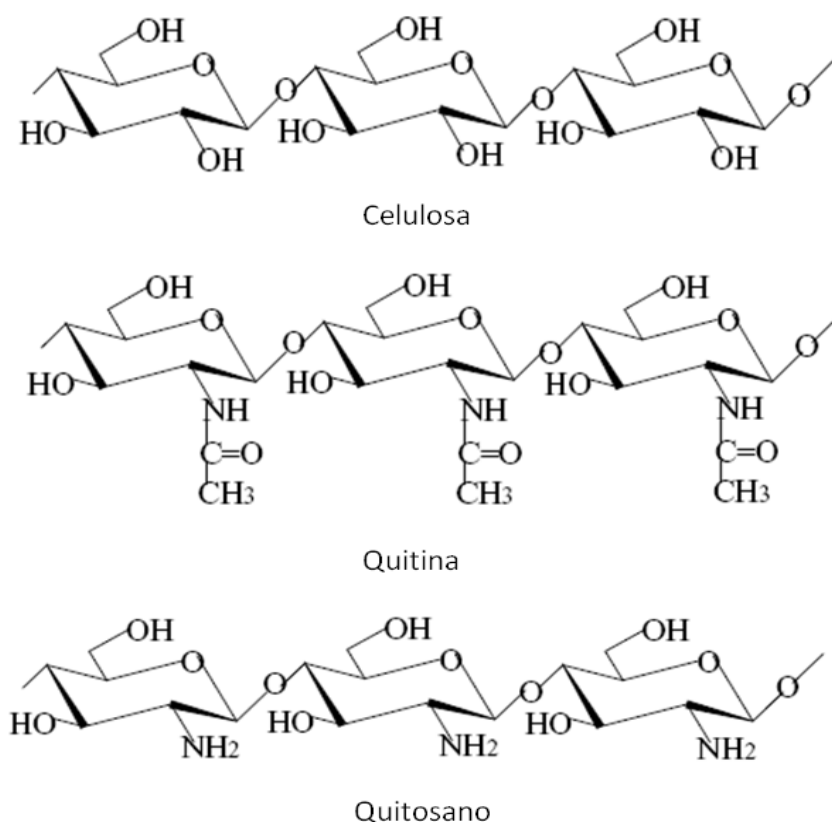
Por último, se ha observado que su consumo puede mejorar la regularidad intestinal en personas con estreñimiento, hecho que probablemente sea atribuible tanto a su condición

de fibra indigerible como a una mejora de las funciones fisiológicas del intestino debido a la producción de SCFA (McCleary & Prosky, 2001).

1.7.7. Quitosano

La quitina es un polisacárido estructural que forma parte del exoesqueleto de invertebrados, crustáceos e insectos, así como de la pared de algunos hongos, levaduras y algas. Se estima que aproximadamente 10 gigatoneladas (10^{13} Kg) de quitina se sintetizan y degradan cada año en la biosfera, siendo considerada el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, sólo por detrás de la celulosa (Muzzarelli & Muzzarelli, 2006). Estructuralmente se trata de una poli-*N*-acetilglucosamina ya que está compuesta por 2-acetoamido-2-deoxi- β -D-glucosas unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) de manera lineal (Shahidi, 2007; Varum & Smidsrod, 2006).

Figura 1-11: Estructura de polímeros de celulosa, quitina y quitosano.



La quitina está formada por unidades de 2-acetoamido-2-deoxi- β -D-glucosas, mientras que el quitosano contiene además unidades de 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosas.

El quitosano (CH) es obtenido principalmente mediante la desacetilación de la quitina, ya que su presencia en la naturaleza es escasa, estando limitada a la pared de algunos hongos. Mientras que la quitina está altamente acetilada, el CH suele tener un grado de desacetilación de entre el 100 y el 40%. El proceso de desacetilación de la quitina se realiza generalmente mediante una hidrólisis en condiciones ácidas o alcalinas (Aranaz et al., 2009). Debido a que la hidrólisis ácida suele conllevar una degradación considerable del polisacárido, la hidrólisis alcalina suele ser la más común para la obtención de CH con finalidades comerciales (Varum & Smidsrod, 2006). No obstante, la hidrólisis ácida suele usarse para la posterior despolimerización y para la obtención de oligómeros de mayor solubilidad. Alternativamente, la hidrólisis de la quitina y el quitosano puede realizarse de manera enzimática mediante la acción de quitinasas, quitosanasas, lisozimas y celulasas (Shahidi, 2007). Tanto la quitina como el CH son insolubles en agua, pero el CH es soluble en soluciones ácidas. Su solubilidad viene determinada por el grado de *N*-acetilación, la distribución de sus grupos acetilo, el pH y la fuerza iónica. Los grupos amino del CH son muy electronegativos y pueden captar protones fácilmente cargándose positivamente. La presencia repetida de grupos amino cargados positivamente permiten que la molécula pueda unirse a superficies cargadas negativamente mediante enlaces iónicos y puentes de hidrógeno (Muzzarelli & Muzzarelli, 2006). Esta característica confiere al CH propiedades de gran utilidad para un amplio espectro de aplicaciones en diferentes ámbitos, como en la industria alimentaria, biomédica, farmacéutica y cosmética, así como en otros sectores industriales como por ejemplo el tratamiento de aguas residuales (**Tabla 1-6**). Aunque la mayoría de aplicaciones del CH son debidas a la presencia de los grupos amino en posición C-2, los grupos hidroxilo en posición C-3 y C-6 pueden desempeñar un papel secundario (Shahidi, 2007).

Tabla 1-6: Ejemplos de aplicaciones del quitosano

Area de aplicación	Ejemplos
Agente antimicrobiano	Bactericida Fungicida
Películas comestibles	Transferencia controlada de la humedad entre el alimento y el ambiente Liberación controlada de sustancias antimicrobianas, antioxidantes, nutrientes o aromas Reducción de la presión parcial de oxígeno Control de la transpiración Reducción del pardeamiento enzimático en frutas
Aditivo alimentario	Clarificación y desacidificación de zumos Preservación de aromas naturales Agente texturizante Agente emulsionante, espesante y estabilizante
Nutrición	Fibra alimentaria Agente hipocolesterolémico Agente antigástrico Tratamiento osteoartritis Encapsulación de nutraceuticos
Biomedicina y farmacia	Piel artificial y cicatrizante Estructuras quirúrgicas Lentes de contacto Diálisis Vesículas artificiales de sangre Agente de transporte y liberación de fármacos
Cosmética	Productos para el pelo y la piel
Agricultura	Recubrimiento de semillas y frutas Fertilizante Fungicida
Tratamiento de aguas	Eliminación de metales pesados, pesticidas fenoles y PBCs Eliminación de radioisótopos
Otros	Inmovilización de enzimas Fabricación de papel Cromatografía Fibra sintética

Fuente: Shahidi (2007)

En el ámbito de la industria alimentaria el CH presenta diferentes aplicaciones de gran interés como por ejemplo en la conservación de alimentos, evitando la degradación microbiana o en la elaboración de biopelículas degradables (Aranaz et al., 2009). Sin embargo, su principal uso es el de complemento alimenticio (Muzzarelli & Muzzarelli, 2006). Debido a que la mayoría de animales carecen de enzimas quitosanasa, el CH es excretado prácticamente inalterado junto con las heces, haciendo que su principal uso sea el de fibra funcional. Diferentes estudios demuestran que el CH presenta propiedades hipolipídicas debido a su capacidad de aumentar la excreción de grasa. La capacidad del CH de disminuir los niveles de colesterol en sangre, principalmente LDL, se ha demostrado tanto en estudios en animales como en humanos, efecto que se atribuye especialmente a su capacidad para aumentar la excreción de esteroides neutros y ácidos biliares (Choi et al., 2012; Liao et al., 2007; Zhang et al., 2012). De hecho la European Food Safety Authority (EFSA) acepta la reivindicación *“el quitosano contribuye al mantenimiento de unos niveles de colesterol en sangre normales”* para un consumo de CH de 3 g por día (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2011). Debido a sus propiedades hipolipídicas también se ha propuesto que el CH podría ser de utilidad para el tratamiento de la obesidad y muchas veces es comercializado para tratamientos relacionados con el control de peso. Sin embargo, su eficacia a este respecto resulta muy controvertida, ya que aunque hay algunos estudios clínicos que muestran resultados favorables por lo que respecta a la pérdida de peso (Muzzarelli, 1999), existen resultados contradictorios (Gades & Stern, 2002; Gades & Stern, 2005) y el meta-análisis de diferentes estudios clínicos revela que no existe suficiente evidencia para sustentar dicho uso (Jull et al., 2008).

No obstante, pese a los numerosos efectos beneficiosos del CH es importante tener en consideración sus posibles efectos adversos cuando su consumo se realiza de manera prolongada o en dosis elevadas. En estas condiciones, el CH podría tener un efecto negativo sobre la salud ósea como consecuencia de una reducción en la absorción de minerales como el calcio debido su efecto quelante; y de vitaminas liposolubles como la vitamina D como consecuencia de su efecto sobre la absorción de grasa (Koide, 1998). De

manera similar, se ha descrito que podría reducir los niveles de otras vitaminas liposolubles como la vitamina E (Deuchi et al., 1995b) o vitaminas como la B12 (Rodrigues & De Oliveira, 2012). Por lo tanto es importante realizar un control adecuado en grupos de riesgo como niños en periodo de crecimiento, mujeres post-menopáusicas y embarazadas, y personas mayores. Adicionalmente, su consumo puede resultar desaconsejable en personas con algún síntoma de malabsorción como, por ejemplo, aquellas personas con esteatorrea recurrente (Koide, 1998).

En resumen, el CH es una fibra con unas propiedades fisicoquímicas que permiten que sea de gran utilidad para un elevado número de aplicaciones. Características como el grado de desacetilación, el grado de polimerización, el peso molecular y la viscosidad influyen de manera determinante en sus propiedades y, por lo tanto, en sus posibles aplicaciones. En consecuencia, el estudio de los mecanismos responsables de los efectos beneficiosos del CH puede ser de interés para la fabricación de polímeros con propiedades y usos específicos.

2. OBJETIVOS

Las ECV y la obesidad suponen un problema de dimensiones globales que requiere de importantes medidas para su prevención. Actualmente, la mayoría de esfuerzos se centran en mejorar malos hábitos alimentarios como evitar el exceso de calorías, especialmente en forma de grasa e hidratos de carbono, y aumentar el consumo de otros nutrientes con importantes beneficios para la salud como es el caso de la fibra alimentaria. No obstante, las estadísticas demuestran que en algunos países occidentales la ingesta real de estos nutrientes se encuentran muy lejos de las cantidades diarias recomendadas.

En países como España se calcula que el porcentaje de calorías consumidas en forma de grasa se sitúa en una mediana del 42%, lo que supone una contribución calórica de grasa muy superior al 35% recomendado como máximo. Resulta todavía más preocupante que menos del 5% de la población cumpla el límite máximo recomendado del 10% para la ingesta de AGS, situándose su consumo habitual en el 12%; y que la ingesta de colesterol se sitúe en torno a los 380 mg/día, alejándose tanto de los objetivos intermedios de menos de 350 mg/día como de los finales de menos de 300 mg/día de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2013).

Los datos no resultan más optimistas por lo que respecta al consumo de fibra, ya que su ingesta ha ido disminuyendo progresivamente en las últimas décadas, cifrándose entre los años 2004 y 2008 en una media de 16 g/día, lo que supone un consumo muy inferior a los 25 g/día recomendados (Ruiz-Roso & Pérez-Olleros, 2010). En base a esto, es necesario aumentar el consumo de fibra, principalmente a través de la ingesta de alimentos habituales de la dieta como cereales, frutas y hortalizas. Sin embargo, la gran diferencia entre los valores reales y recomendados de consumo de fibra hace que los preparados comerciales como alimentos funcionales o complementos alimenticios también sean contemplados como una opción de gran interés, siempre y cuando sean consumidos con moderación y no sustituyan a una dieta equilibrada.

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado los efectos beneficiosos del consumo de fibra sobre el metabolismo lipídico y, más concretamente, sobre los niveles

de colesterol. No obstante, no todos los compuestos que se engloban dentro de la definición de “fibra alimentaria” presentan los mismos efectos fisiológicos, ni sus beneficios son atribuibles a los mismos mecanismos. Además, aunque se ha estudiado el efecto de algunas fibras sobre la absorción de grasa, hasta la fecha, prácticamente no existen estudios que hayan evaluado su efecto sobre los distintos tipos de ácidos grasos. Este hecho resulta muy importante debido a que los ácidos grasos tienen una repercusión muy diferente, e incluso contraria, sobre el metabolismo lipídico y los niveles de colesterol.

Por ello, el principal objetivo de la presente Tesis Doctoral fue **comparar la capacidad de reducir de manera selectiva la absorción de grasa y la repercusión sobre el metabolismo lipídico de fibras alimentarias con diferentes propiedades fisicoquímicas**, como la goma guar parcialmente hidrolizada, la maltodextrina resistente a la digestión y el quitosano.

La elección de la goma guar parcialmente hidrolizada y la maltodextrina resistente a la digestión como fibras de estudio se debió a que son fibras con propiedades fisicoquímicas de utilidad para su incorporación en alimentos, mientras que el quitosano fue elegido porque presenta propiedades catiónicas que sugieren que podría tener capacidad *fat-binding* (ligando de grasa) selectiva.

Con la finalidad de alcanzar el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos más concretos:

- Estudiar el efecto del consumo de estas fibras sobre la ganancia de peso y el consumo de alimento (pienso).
- Estudiar a lo largo del tiempo (estudio longitudinal) el efecto de estas fibras sobre la excreción de lípidos. Más concretamente, sobre la excreción de ácidos grasos, esteroides neutros y ácidos biliares.
- Evaluar la repercusión del consumo de las fibras sobre el perfil lipídico de plasma e hígado, así como sobre otros parámetros bioquímicos.

Finalmente, un objetivo secundario fue desarrollar un método para la determinación precisa de la concentración de hidroperóxidos en plasma que permitiese evaluar el efecto

del consumo de fibra sobre los niveles de oxidación plasmática y que, a su vez, fuese de utilidad para futuros estudios.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. INTRODUCCIÓN AL DISEÑO EXPERIMENTAL

En base a los objetivos se estableció un diseño experimental con la finalidad de estudiar la capacidad *fat-binding* selectiva de diferentes fibras alimentarias y, a su vez, esclarecer y comparar sus mecanismos hipolipidémicos. Para ello el estudio se dividió en dos fases experimentales:

- En una **primera fase experimental** se comparó el efecto de cuatro fibras experimentales con propiedades fisicoquímicas diferentes. En primer lugar, se incluyeron en el estudio dos gomas guar parcialmente hidrolizadas con diferente grado de viscosidad la finalidad de estudiar la repercusión de esta característica sobre sus propiedades hipolipidémicas. Además, se estudió el efecto de una maltodextrina resistente a la digestión, como ejemplo de fibra soluble no viscosa. Finalmente, se incluyó en el estudio una fibra o polímero de quitosano bajo la hipótesis de que sus propiedades fisicoquímicas diferenciales podían conllevar que presentase un mecanismo hipolipidémico muy diferente a las otras fibras.
- La **segunda fase experimental** se diseñó a partir de los resultados obtenidos en la primera fase. Tal y como se discute en detalle en las diferentes publicaciones y la discusión (Véase **Discusión general**), en la primera fase se observó que el quitosano fue la fibra estudiada cuyo efecto sobre la excreción de AG presentaba mayor interés. En base a esto, la segunda fase experimental se diseñó con el objetivo de confirmar las observaciones realizadas en la primera fase y, sobre todo, con la finalidad de obtener un mayor conocimiento de cómo sus propiedades fisicoquímicas, y más concretamente su viscosidad, podían influir sobre su capacidad *fat-binding* específica.

3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y ANIMALES

Los procedimientos experimentales con animales tuvieron lugar en el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y

contaron con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona en base al Decreto 214/97 de la Generalitat de Catalunya.

Como animales de experimentación se utilizaron cobayas hembra (*Cavia porcellus*) Dunkin-Hartley de aproximadamente 4 semanas de edad. Los animales fueron estabulados en condiciones controladas de ciclos de luz (08:00h-20:00h), humedad y temperatura, y jaulas que tenían una base con rejilla de acero inoxidable para evitar la coprofagia. La comida y la bebida fue suministrada *ad libitum* durante todo el estudio.

3.2.1. La cobaya como modelo de experimentación animal

La cobaya o “conejillo de Indias” (*Cavia porcellus*) presenta una serie de características que lo hacen un modelo muy adecuado para el estudio del metabolismo de las lipoproteínas, la aterosclerosis y la inflamación en comparación a otros animales de experimentación utilizados más comúnmente (Fernandez & Volek, 2006; Ye et al., 2013).

Una de las principales características del metabolismo de las cobayas que resulta de gran utilidad para el presente estudio es que sus niveles de colesterol LDL sufren alteraciones en respuesta a la saturación de la grasa, el colesterol y la fibra alimentaria de la dieta (Fernandez & Volek, 2006). De hecho, las cobayas sometidas a dietas ricas en grasa y colesterol desarrollan lesiones aórticas características de la aterosclerosis que no se observan en cepas comunes de rata y ratón (Ye et al., 2013). Una de las principales similitudes con los humanos es que la mayoría de colesterol es transportado en las lipoproteínas LDL, mientras que en otros modelos como la rata o el ratón tiene lugar en las HDL (Fernandez & Volek, 2006). Además, presenta CETP, un componente crítico para transporte reverso del colesterol que está ausente en la mayoría de roedores (Haa & Barter, 1982). Las cobayas presentan además LCAT y LPL, las cuales contribuyen a la remodelación de las lipoproteínas plasmáticas y, por lo tanto, a sus funciones fisiológicas (Grove & Pownall, 1991). Otra similitud interesante consiste en que las hembras presentan niveles de HDL superiores a los machos y que al ser ovariectomizadas su perfil lipídico se asemeja al de las mujeres post-menopáusicas (Fernandez et al., 2001; Roy et al., 2000). Algunas de estas características también están presentes en el hámster. Esto hace

que para estudios de metabolismo lipídico a veces sea considerado una opción más realista que la rata y el ratón, y más económica que las cobayas. No obstante, el estómago del hámster presenta una segunda cámara que le permite fermentar la fibra antes de llegar al intestino, lo que supone una gran desventaja para estudios destinados a evaluar los efectos de la fibra alimentaria (Fernandez et al., 1999).

A nivel hepático las cobayas presentan mayores concentraciones de colesterol libre que esterificado y la síntesis endógena de colesterol es comparable a la de los humanos. Las cobayas requieren vitamina C al igual que los humanos y a diferencia de otros roedores que tienen la capacidad de sintetizarla endógenamente. Debido a la capacidad antioxidante de la vitamina C, ésta puede tener un importante papel en los procesos de oxidación y aterosclerosis (Fernandez & Volek, 2006).

En conclusión, aunque el estudio con cobayas puede suponer un coste superior y una mayor dificultad desde el punto de vista logístico en comparación a otros animales más comúnmente utilizados, su uso como modelo animal proporciona un mayor rigor científico en estudios destinados a la evaluación de los efectos del consumo de fibra alimentaria sobre el metabolismo lipídico.

3.2.2. *Diseño primera fase experimental*

En esta fase experimental se utilizaron un total de 40 cobayas hembra que fueron estabuladas a razón de 2 animales por jaula. Los animales fueron alimentados durante una primera semana de aclimatación o cuarentena con la misma dieta que posteriormente se utilizaría como control negativo y cuya fuente de fibra era celulosa. Trascorrida esta primera semana los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos experimentales (8 animales por grupo). Los animales fueron alimentados durante 28 días con dietas experimentales que presentaban la misma composición, exceptuando el tipo de fibra.

3.2.2.1. Dietas experimentales

Las dietas fueron preparadas tras la adición de las diferentes fibras a un pienso base sin fibra y fueron administradas en forma de polvo. Las dietas fueron ricas en grasa y una elevada relación de AGPI n-6/n-3 como modelo de dieta de algunos países occidentales, especialmente aquellos que presentan un elevado consumo de cereales y bajo consumo de pescado, como por ejemplo Estados Unidos (Simopoulos, 2002). Las principales características de la composición final de la dieta fueron las que se indican en la siguiente tabla.

Componente	g/100g	
Proteínas:	18,1%	
Hidratos de carbono:	44,3%	En forma de almidón/sacarosa (1:1,43)
Grasa:	16,9%	En forma de aceite de oliva/palmiste/girasol (1:2:1,8)
<i>De composición en AG:</i>		
	AGS	39%
	AGMI	12%
	AGPI n-6	37%
	AGPI n-3	2%
Colesterol:	0,04% ¹	Dieta normocolesterolémica
Fibra:	12%	
Minerales:	4,6%	
Vitaminas:	1%	

El porcentaje de humedad de la dieta fue del 3% aproximadamente.

¹ El porcentaje de colesterol se expresa como g por cada 100 g de dieta pero quedaría incluido dentro del porcentaje de grasa total.

Las diferentes fuentes de fibras utilizadas para cada uno de los 5 grupos experimentales fueron:

- Celulosa (CE): Como control negativo. Usada también durante el periodo de cuarentena.

- Goma guar parcialmente hidrolizada durante 1 h (PHGG1): Obtenida a partir de la hidrólisis química de goma guar de *Cyamopsis tetragonoloba* con H₂O:EtOH (1:1) a 100°C y 4 bares de presión durante 1 hora.
- Goma guar parcialmente hidrolizada durante 2 h (PHGG2): Obtenida a partir de la hidrólisis química de goma guar de *Cyamopsis tetragonoloba* con H₂O:EtOH (1:1) a 100°C y 4 bares de presión durante 2 horas.
- Maltodextrina resistente a la digestión (MD): Adquirida como producto comercial Fibersol-2bTM de Matsutani Chemical Industry Co. (Hyogo, Japón).
- Quitosano (CH): Adquirido como producto comercial ChitoclearTM de Primex Chemicals (Siglufjordur, Iceland) con un grado de desacetilación del 94% y una viscosidad de 23 mPa·s diluido al 1% en ácido acético 0,1M (según especificaciones del fabricante).

3.2.2.2. Datos y muestras obtenidas.

- Consumo de pienso y peso del animal: Se monitorizó el consumo de pienso y el peso del animal cada 48 h.
- Heces: Se recogió la totalidad de las heces excretadas cada 48 h. Las heces fueron homogeneizadas, liofilizadas y conservadas a -20°C.
- Plasma: Trascorridos los 28 días de experimentación los animales fueron sacrificados (sin ayuno previo). Para ello se anestesió a los animales con isoflurano vía inhalatoria y se extrajo un volumen máximo de sangre por punción intracardiaca. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos que contenían heparina de litio y el plasma se separó tras la centrifugación de las muestras de sangre a 1500g durante 15 min. Las muestras de plasma se conservaron a -80°C hasta el momento de su análisis.
- Hígado: Los hígados se obtuvieron en el momento del sacrificio y fueron inmediatamente pesados y homogeneizados. Las muestras de hígado fueron conservadas a -80°C.

3.2.3. *Diseño segunda fase experimental*

En esta fase experimental se utilizaron un total de 24 cobayas hembra que fueron estabuladas en jaulas individuales. Los animales fueron alimentados durante una primera semana de aclimatación o cuarentena con dieta estándar para cobayas (2040 Teklad Global Diet de Harlan). Trascorrida esta primera semana los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos experimentales (8 animales por grupo). Los animales fueron alimentados durante 28 días con dietas hipercolesterolémicas ricas en grasa que presentaban la misma composición, exceptuando el tipo de fibra.

3.2.3.1. *Dietas experimentales*

Las dietas experimentales se obtuvieron tras la adición de las diferentes fibras a una dieta basal sin fibra y se administraron en forma de *pellet*. Las principales características de la composición de la dieta fueron las que se muestran en la siguiente tabla.

Componente	g/100 g	
Proteínas:	18,8%	
Hidratos de carbono:	45,6%	En forma de almidón/sacarosa (1:1,43)
Grasa:	17,1%	En forma de aceite de oliva/palmiste/girasol (1:2:1,8)
<i>De composición en AG:</i>		
AGS	47%	
AGMI	21%	
AGPI n-6	31%	
AGPI n-3	1%	
Colesterol:	0,2% ¹	Dieta hipercolesterolémica
Fibra:	12%	
Minerales:	5,5%	
Vitaminas:	1%	

El porcentaje de humedad de la dieta fue prácticamente despreciable.

¹ El porcentaje de colesterol se expresa como g por cada 100 g de dieta pero quedaría incluido dentro del porcentaje de grasa total.

Las diferentes fuentes de fibras usadas para cada uno de los 3 grupos experimentales fueron:

- Celulosa (CE): Como control negativo.
- Quitosano de baja viscosidad (LV): Adquirido como producto comercial Chitopharm® S de Cognis Iberia (Barcelona) con un grado de desacetilación del 70% (según especificaciones del fabricante).
- Quitosano de alta viscosidad (HV): Adquirido como producto comercial Chitopharm® L de Cognis Iberia (Barcelona) con un grado de desacetilación del 70% (según especificaciones del fabricante).

3.2.3.2. Datos y muestras obtenidas:

- Consumo de pienso y peso del animal: Se monitorizó el consumo de pienso y el peso del animal con una periodicidad mínima de 3 veces por semana
- Heces: Una vez por semana, se recogió la totalidad de las heces excretadas durante periodos de 48 h. Las heces fueron homogeneizadas, liofilizadas, envasadas al vacío y conservadas a -20°C.
- Plasma: A diferencia de la primera fase experimental las muestras se obtuvieron tras mantener a los animales en ayunas *overnight*. También se recogieron muestras de sangre a tiempo 0 mediante punción en vena safena (aprox. 200 µL de sangre). Trascorridos los 28 días de experimentación los animales fueron sacrificados. Para ello se anestesió a los animales con isoflurano vía inhalatoria y se obtuvo un volumen máximo de sangre por punción intracardiaca. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos que contenían heparina de litio y el plasma se separó mediante centrifugación de la muestra a 1500g durante 15 min a 4°C. Las muestras de plasma se conservaron a -80°C hasta el momento de su análisis.
- Hígado: Los hígados se obtuvieron en el momento del sacrificio y fueron inmediatamente pesados y homogeneizados. Las muestras de hígado fueron conservadas a -80°C.

3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS REALIZADAS

A continuación se resumen los diferentes análisis realizados en el global de la presente Tesis para las diferentes muestras obtenidas.

Piensos

- Confirmación del análisis de grasa total proporcionado por el fabricante mediante el método oficial AOAC 2003.05.
- Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases (López-López et al., 2000)
- Determinación de esteroides neutros por cromatografía de gases (Keller & Jahreis, 2004).
- Estudio de la viscosidad de las fibras PHGG1, PHGG2, LV y HV (Véase **Publicaciones 4.1 y 4.4**).

Heces

- Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases (López-López et al., 2000)
- Determinación de esteroides neutros y ácidos biliares por cromatografía de gases (Keller & Jahreis, 2004)

Plasma

- Composición en ácidos grasos por cromatografía de gases (Véase **Publicación 4.3**).
- Determinación de glucosa en base al método de la glucosa oxidasa mediante kits enzimáticos comerciales.
- Determinación de triglicéridos en base al método de la glicerol fosfato oxidasa mediante kits enzimáticos comerciales.
- Determinación de colesterol total y en diferentes fracciones de lipoproteínas en base al método de la colesterol oxidasa mediante kits enzimáticos comerciales.
- Determinación de fosfolípidos mediante kits enzimáticos comerciales.
- Cuantificación del contenido total de hidroperóxidos mediante el método de la difenil-1-pirenil fosfina (Véase **Publicación 4.5**)

Hígado

- Composición en ácidos grasos por cromatografía de gases (Véase **Publicación 4.3**).
- Determinación de triglicéridos en base al método de la glicerol fosfato oxidasa mediante kits enzimáticos comerciales.
- Determinación de colesterol libre y esterificado en base al método de la colesterol oxidasa mediante kits enzimáticos comerciales.
- Determinación de fosfolípidos en base al método de la colina oxidasa mediante kits enzimáticos comerciales.

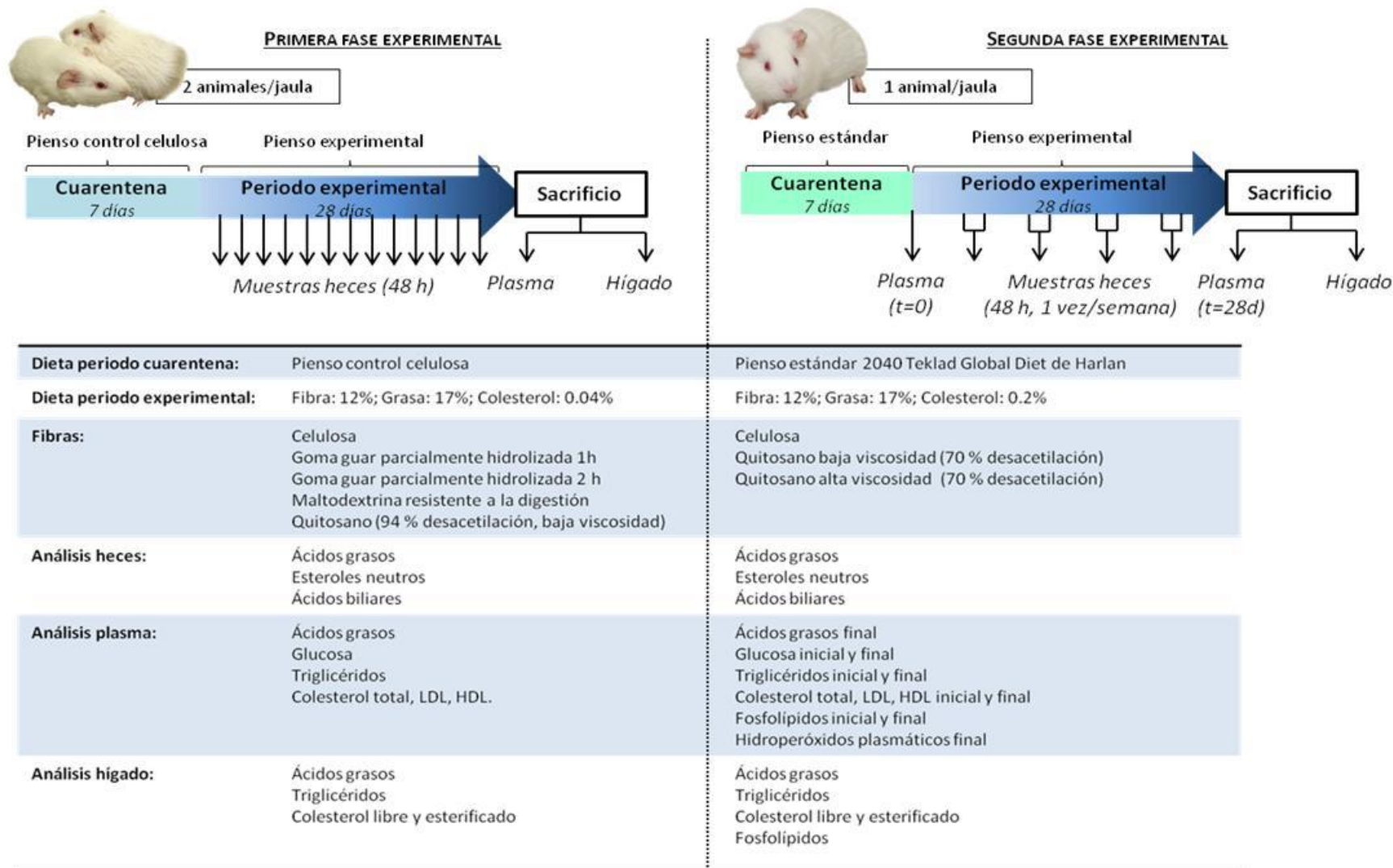
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos han sido analizados mediante el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS v17) para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). La normalidad de los datos fue comprobada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene.

Cualquier diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ha sido determinada mediante análisis de la varianza (ANOVA). La naturaleza exacta de las diferencias entre grupos fue determinada mediante el test de comparación múltiple *Duncan's new multiple range test*. Para la determinación de diferencias entre los valores iniciales y finales de muestras pertenecientes a un mismo tratamiento se realizó una prueba *t* de Student para datos pareados.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0,05$. En general, los datos a lo largo de la presente Tesis Doctoral se expresan como medias y error estándar de la media.

Figura 3-1: Resumen y comparación de análisis realizados en la primera y en la segunda fase experimental.



4. RESULTADOS

Como resultado del trabajo experimental realizado se han elaborado cuatro publicaciones de resultados:

Primera fase experimental:

- Partially hydrolyzed guar gums reduce dietary fatty acid and sterol absorption in guinea pigs independent of viscosity

Jonathan Santas, Jordi Espadaler, Jordi Cuñé y Magda Rafecas

Lipids, 47:7, 697-705 (2012)

Índice de impacto (2011): 2,129

- Selective in vivo effect of chitosan on fatty acid, neutral sterol and bile acid excretion: A longitudinal study

Jonathan Santas, Jordi Espadaler, Remedios Mancebo y Magda Rafecas

Food Chemistry 134 (2): 940-947 (2012).

Índice de impacto (2011): 3,655

- Effect of partially hydrolyzed guar gum, digestion-resistant maltodextrin and chitosan on plasma and liver lipid content and fatty acid profile in guinea pigs

Jonathan Santas, Jordi Cuñé y Magda Rafecas

En proceso de revisión

Segunda fase experimental:

- Comparison of the hypolipidemic activity of high and low viscosity chitosans in guinea pigs: Effect on plasma and liver lipid content and fatty acid profile.

Jonathan Santas, Jordi Cuñé y Magda Rafecas

En proceso de revisión

Para la elaboración de esta última publicación se desarrolló un método analítico que ha dado lugar a una publicación de método:

- Determination of total plasma hydroperoxides using a diphenyl-1-pyrenylphosphine fluorescent probe

Jonathan Santas, Francesc Guardiola, Magda Rafecas y Ricard Bou

Analytical Biochemistry, 434 (1), 172-177 (2013)

Índice de Impacto (2011): 2,996

4.1. LA GOMA GUAR PARCIALMENTE HIDROLIZADA REDUCE LA ABSORCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES DE LA DIETA EN COBAYAS INDEPENDIENTEMENTE DE SU VISCOSIDAD.

Jonathan Santas, Jordi Espadaler, Jordi Cuñé, Magda Rafecas

Lipids, 47 (7), 697-705 (2012)

Resumen

El presente estudio investiga el efecto de dos gomas guar parcialmente hidrolizadas (PHGG) sobre la excreción de ácidos grasos y esteroides. Las PHGG se obtuvieron a partir de la goma guar mediante una hidrólisis química con H₂O:EtOH (1:1) a 100 °C durante 1h (PHGG1) o 2h (PHGG2). La viscosidad de las PHGG en disolución acuosa al 1% fue característica de un fluido pseudoplástico y fue superior para la PHGG1 en comparación con la PHGG2. Se alimentaron cobayas (n=8) durante 4 semanas con dietas ricas en grasa (17 g/100 g) y que contenían 12 g/100 g de celulosa, PHGG1 o PHGG2. Pese a la diferencia de viscosidad, las dos PHGG presentaron efectos fisiológicos similares. En comparación con el grupo control celulosa, la ganancia de peso fue inferior en animales alimentados con PHGG, aunque no se observaron diferencias en el consumo de pienso. Las PHGG incrementaron la excreción de ácidos grasos y esteroides neutros, pero no de ácidos biliares. El consumo de PHGG no alteró el perfil de ácidos grasos de las heces, mientras que la bioconversión de esteroides tendió a incrementar en aquellos animales alimentados con PHGG2. Dentro de los niveles estudiados, una reducción de la viscosidad no se correlacionó con una pérdida de la capacidad hipocolesterolemia de las PHGG ya que ambas fueron efectivas reduciendo el colesterol plasmático. En conclusión, la hidrólisis química de la goma guar puede facilitar su inclusión en alimentos manteniendo sus efectos beneficiosos para la salud.

Partially Hydrolyzed Guar Gums Reduce Dietary Fatty Acid and Sterol Absorption in Guinea Pigs Independent of Viscosity

Jonathan Santas · Jordi Espadaler ·
Jordi Cuñé · Magda Rafecas

Received: 15 December 2011 / Accepted: 15 May 2012

© AOCS 2012

Abstract This study investigated the effect of two partially hydrolyzed guar gums (PHGG) on fatty acid and sterol excretion. PHGG were obtained by chemical hydrolysis of guar gum (GG) with H₂O:EtOH (1:1) at 100 °C for 1 h (PHGG1) or 2 h (PHGG2). The viscosity of the PHGG in a 1 % (w/v) aqueous solution corresponded to that of a pseudoplastic fluid and was higher for PHGG1 than PHGG2. Guinea pigs (*n* = 8 per group) were fed high fat diets (17/100 g) that contained 12/100 g of cellulose, PHGG1, or PHGG2 for 4 weeks. Despite the differences in viscosity, the two PHGG exerted similar physiological effects. Compared to the control cellulose group, the body weight gain was lower in animals fed PHGG, although no effect on food consumption was observed. PHGG increased the excretion of fatty acids and neutral sterols, but not bile acids. Consumption of PHGG did not alter the fecal fatty acid profile, while intestinal bioconversion of sterols tended to increase in response to PHGG2. A reduction in the viscosity within the range tested did not correlate with losses in the hypocholesterolemic capacity of PHGG as both were effective in reducing plasma cholesterol. Thus, we conclude that the chemical hydrolysis of guar gum renders the gum suitable for inclusion in food products without significantly altering its beneficial health effects.

Keywords Dietary fiber · Partially hydrolyzed guar gum · Fatty acids · Cholesterol · Bile acids

J. Santas · M. Rafecas (✉)
Department of Nutrition and Food Science, XaRTA-INSA,
University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
e-mail: magdarafecas@ub.edu

J. Santas · J. Espadaler · J. Cuñé
AB-Biotics, S.A., Parc Tecnològic del Vallès,
08290 Cerdanyola del Vallès, Spain

Abbreviations

BA	Bile acid(s)
CA	Cholic acid
CDCA	Chenodeoxycholic acid
CE	Cellulose
DCA	Deoxycholic acid
FA	Fatty acid(s)
FAME	Fatty acid methyl ester(s)
FID	Flame ionization detector
GG	Guar gum
LCA	Lithocholic acid
LDL	Low density lipoprotein
MUFA	Monounsaturated fatty acid(s)
NS	Neutral sterol(s)
PHGG	Partially hydrolyzed guar gum
PHGG1	Partially hydrolyzed guar gum for 1 h
PHGG2	Partially hydrolyzed guar gum for 2 h
PUFA	Polyunsaturated fatty acid(s)
SEM	Standard error of the mean
SFA	Saturated fatty acid(s)
TSFA	Total saturated fatty acids
TUFA	Total unsaturated fatty acids
UDCA	Ursodeoxycholic acid
UFA	Unsaturated fatty acid(s)

Introduction

Guar gum (GG) is a natural polysaccharide that consists of a (1 → 4)- α -D-mannopyranose backbone with single units of linked α -D-galactopyranose. Given its hypolipidemic and hypoglycemic effects, this gum is considered one of the most promising water-soluble dietary fibers [1, 2]. There is

strong evidence that GG decreases the incidence of factor risks associated with cardiovascular diseases, such as high levels of plasma triglycerides and cholesterol, mainly LDL-cholesterol [2, 3]. The hypolipidemic effects of this gum are attributed to its capacity to decrease the absorption of dietary fat and cholesterol, reduce bile acid reabsorption in the small intestine, and produce short chain fatty acids by partial fermentation in the cecum [4, 5].

GG is widely known for its water-soluble characteristics and viscosity [4, 6]. In manufactured or processed foods, gums are commonly used as thickeners and emulsifiers. However, the high viscosity of GG may limit its use at physiologically effective concentrations in some food products [7]. Partial hydrolysis has recently been reported to improve the inclusion of this gum in food products and increase consumer acceptance [8]. For instance, Sunfiber® is a PHGG product that is commercially available and has GRAS status (Generally Recognized As Safe) in the USA [7]. The viscosity of enzymatically hydrolyzed GG can be as low as 10 mPa s in a 5 % aqueous solution, while that of commercially available GG is about 2,000–3,000 mPa s in a 1 % aqueous solution [7]. Nevertheless, it has been reported that the health benefits of partially hydrolyzed GG (PHGG) are similar to those of intact GG [7, 9]. Therefore, it has been proposed that the health benefits of PHGG do not appear to be exclusively dependent on its molecular weight or viscosity and that hypolipidemic mechanisms other than viscosity may be involved [8].

Various studies have reported the capacity of dietary fiber to reduce fat absorption. However, dietary fat exerts a range of effects on lipid metabolism depending on its sterol and fatty acid composition [10]. In general, *trans* fatty acids and most saturated fatty acids (SFA) are considered hyperlipidemic. For instance, lauric (C12:0), myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids increase the plasma concentration of LDL-cholesterol mainly by decreasing the activity of its receptors in the liver [11]. In contrast to SFA, monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) decrease LDL-cholesterol by a series of mechanisms, such as enhancing the hepatic uptake of LDL particles or the activity of 7 α -hydroxylase [12]. To our knowledge, only a few studies have addressed the effect of functional ingredients on the absorption of individual fatty acids. Interestingly, some of these ingredients exert selective fat-binding capacity, thereby affecting plasma and liver lipid profiles [13, 14]. Given all these considerations, the study of the effect of dietary fiber on each fatty acid is relevant.

Here, we examined the effect of chemically hydrolyzed guar gum on lipid excretion in order to provide new insights into its hypolipidemic mechanism. The effect of PHGG on fat excretion was studied longitudinally and an exhaustive analysis of fecal sterols and fatty acids was

conducted to assess the effect of fiber on fat excretion over time. For this purpose, we used the guinea pig as it is widely accepted as a more reliable model of human lipid metabolism than other more commonly used animals, such as mice or rats, and because, in contrast to hamsters, guinea pigs do not ferment fiber in their stomachs [15].

Materials and Methods

Materials

Fatty acid methyl ester (FAME) standards were of 99 % or higher purity. Oleic acid (C18:1n-9), linolenic acid (C18:3n-3) and heneicosanoate acid (C21:0) were purchased from Larodan Fine Chemical AB (Malmö, Sweden). The remaining FAME standards, bile acids, Sylon BTZ (3:2:3, BSA + TMCS + TMSI) and anhydrous pyridine were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sterol standards were supplied by Steraloids (Newport, Rhode Island, USA).

Sodium methylate 0.5 N was prepared by dissolving 17 g of sodium in 1 L of dry methanol. *N*-hexane and boron trifluoride (20 % in anhydrous methanol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride and anhydrous sodium sulfate were from Panreac (Barcelona, Spain) whereas chloroform, cyclohexane, methanol, ethanol and diethyl ether were purchased from Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, Spain). All solvents and reagents were of analytical grade or higher and double distilled water was used throughout the study.

Production of PHGG

PHGG was obtained by chemical hydrolysis of natural GG from *Cyamopsis tetragonoloba*. The hydrolysis was conducted in a reactor vessel with H₂O:EtOH (1:1) at 100 °C, 4 bar and constant magnetic stirring at 700 rpm. GG was added into the pre-warmed reactor at a concentration of 15 % (w/v) and hydrolyzed for either 1 h (PHGG1) or 2 h (PHGG2). After hydrolysis, the reactor vessel was allowed to cool to 50 °C and samples were passed through a filter plate of porosity No. 2 (40–100 μ m, Vidrafoc, S.A., Barcelona, Spain). The residue was subsequently washed twice with 100 mL of EtOH 95 % and allowed to dry for 5 h at 40 °C in a vacuum oven.

Determination of Viscosity and Rheological Properties of PHGG

The viscosity of 1 % aqueous dispersions of PHGG was determined using a First RM Rheometer from Lamy Rheometers (Champagne au Mont d'Or, France). Homogeneous

4.2. EFECTO SELECTIVO *IN VIVO* DEL QUITOSANO SOBRE LA EXCRECIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, ESTEROLES NEUTROS Y ÁCIDOS BILIARES: UN ESTUDIO LONGITUDINAL.

Jonathan Santas, Jordi Espadaler, Remedios Mancebo, Magda Rafecas

Food Chemistry 134 (2): 940-947 (2012)

Resumen

El quitosano (CH), un compuesto obtenido a partir de la desacetilación de la quitina, es una fibra alimentaria conocida por sus propiedades hipolipidémicas, comúnmente atribuidas a sus características catiónicas únicas. En el presente estudio se evaluó el efecto selectivo *in vivo* del CH sobre la excreción de grasa con la finalidad de esclarecer su mecanismo hipolipidémico. Para ello, se realizó un estudio longitudinal de 4 semanas en cobayas y se comparó el efecto del CH sobre la absorción de grasa con el de una fibra soluble: una maltodextrina resistente a la digestión (MD). Los animales fueron alimentados con dietas isocalóricas ricas en grasa que contenían 12 g/100 g de celulosa, MD o CH, y se determinó la excreción de ácidos grasos, esteroides neutros y ácidos biliares. El CH redujo la absorción de grasa de forma selectiva en comparación con la MD. En aquellos animales alimentados con CH la excreción de los ácidos grasos laúrico, mirístico y palmítico incremento más de 10, 5 y 2 veces, respectivamente, en comparación al grupo celulosa, mientras que la excreción de ácido esteárico no se vió alterada significativamente. La excreción de los ácidos grasos oleico, linoleico y α -linolénico también fue significativamente superior ($P < 0.001$). La relación de ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3 en las heces de aquellos animales alimentados con CH fue de 23.68 mientras que en los alimentados con celulosa fue de 13.95. Las dos fibras estudiadas aumentaron la excreción total de esteroides neutros, pero sólo el CH incrementó la excreción de ácidos biliares. No obstante, el CH inhibió la bioconversión a nivel intestinal del colesterol y los ácidos biliares primarios a sus respectivos metabolitos

secundarios. En consecuencia, los resultados revelan que la actividad hipolipidémica del CH y la MD es atribuible a mecanismos diferentes.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Selective *in vivo* effect of chitosan on fatty acid, neutral sterol and bile acid excretion: A longitudinal study

Jonathan Santos^{a,b}, Jordi Espadaler^b, Remedios Mancebo^c, Magda Rafecas^{a,*}^a Department of Nutrition and Food Science, XaRTA-INSA, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain^b AB-Biotics, S.A. Parc Tecnològic del Vallès, 08290 Cerdanyola del vallès, Barcelona, Spain^c Damm Group Central Laboratory, S.A. DAMM, 08820 Prat del Llobregat, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2011

Received in revised form 16 January 2012

Accepted 29 February 2012

Available online 9 March 2012

Keywords:

Chitosan

Digestion-resistant maltodextrin

Fatty acids

Cholesterol

Bile acids

Cardiovascular diseases

ABSTRACT

Chitosan, a deacetylated form of chitin, is a dietary fibre known for its hypolipidemic properties, which are mainly attributed to its unique cationic characteristics. We studied the selective *in vivo* effect of chitosan on fat excretion in order to elucidate its hypolipidemic mechanism. A 4-week longitudinal study was conducted in guinea pigs and the effect of chitosan on fat-absorption was compared to that of a soluble fibre: digestion-resistant maltodextrin. Animals were fed with high-fat isocaloric diets containing 12/100 g of cellulose, digestion-resistant maltodextrin or chitosan. Subsequently, the excretion of fatty acids, neutral sterols and bile acids was determined. Chitosan selectively reduced fat absorption in comparison to digestion-resistant maltodextrin. The excretion of lauric, myristic and palmitic fatty acids of animals fed with chitosan was more than 10-, 5- and 2-fold higher, respectively, than in the cellulose group, whereas stearic acid excretion was not significantly altered. Oleic, linoleic and α -linolenic acid excretion were also significantly higher ($P < 0.001$). The $n-6/n-3$ ratio in faeces of the chitosan group was 23.68, compared to 13.95 in the cellulose group. Total neutral sterol excretion was increased by both dietary fibres, whereas bile acid excretion was only increased by chitosan. Nevertheless, chitosan inhibited the intestinal bioconversion of cholesterol and primary bile acids to secondary metabolites. Hence, these results reveal that chitosan and digestion resistant maltodextrin exert their hypolipidemic activity by different mechanisms.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coronary heart disease (CHD) is the leading cause of death in developed countries (Lloyd-Jones et al., 2010). Although its aetiology is multifactorial, high intakes of calories and fats, especially cholesterol-rich fats as well as saturated and *trans* fatty acids, are widely accepted as major contributing factors (Erkkila, de Mello, Riserus, & Laaksonen, 2008; Lloyd-Jones et al., 2010). Dietary interventions, such as reducing fat ingestion or its bioavailability, are therefore proposed as primary treatments to lower the risk of CHD (Badimon, Vilahur, & Padro, 2010).

Evidence shows that dietary fibre may play an important role in the prevention of CHD due to its capacity to lower plasma lipid concentrations, especially that of LDL cholesterol (Elleuch et al., 2011; Viuda-Martos et al., 2010). In general terms, the hypolipidemic properties of dietary fibre have mainly been associated with its capacity to reduce carbohydrate absorption, fat digestibility and bile acid circulation (Kishimoto, Wakabayashi, & Takeda, 1995). However, it is widely known that fatty acids, the main constituents

of dietary fat, elicit different lipid metabolism responses, and thus have different repercussions on the blood lipid profile and other cardiovascular risk factors (Erkkila et al., 2008; Fernandez & West, 2005; Moreno & Mitjavila, 2003).

Trans fatty acids and saturated fatty acids (SFAs) are known for their detrimental effect on plasma lipids. Nevertheless, recent studies demonstrate that SFAs can also be divided into different metabolic groups, according to their effects on lipid metabolism. Short-chain (4–8 carbon) SFAs and medium-chain decanoic fatty acid (C10:0), as well as long-chain stearic acid (C18:0), do not increase the risk of CHD. In contrast, lauric (C12:0), myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids can raise LDL-cholesterol (LDL-c) concentrations, mainly by decreasing LDL receptor activity (Fernandez & West, 2005). Monounsaturated fatty acids (MUFAs) and $n-6$ and $n-3$ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can decrease LDL-c by different mechanisms (Bays, Tighe, Sadovsky, & Davidson, 2008; Moreno & Mitjavila, 2003). However, recent studies have suggested that excessive amounts of $n-6$ PUFAs and very high $n-6/n-3$ ratios may promote the pathogenesis of many diseases associated to proinflammatory and prothrombotic mediators, such as asthma, cancer and autoimmune diseases (Chilton, Rudel, Parks, Arm, & Seeds, 2008). Consequently, it has been suggested to reduce the

* Corresponding author. Tel.: +34 934034841; fax: +34 934035931.

E-mail address: magdarafecas@ub.edu (M. Rafecas).

$n-6/n-3$ ratio in the diets in order to reduce the risk of many chronic diseases (Simopoulos, 2002). These suggestions are not devoid of controversy, as they are opposed to recent publications (Fritsche, 2008; Harris et al., 2009).

Digestion-resistant maltodextrin (MD) and chitosan (CH) are dietary fibres that differ in their physicochemical characteristics (Aranaz et al., 2009; Kishimoto et al., 2009). Its use as functional food ingredients is supported by their widely reported hypocholesterolemic activity (Bondiolotti et al., 2011; Ikeda et al., 1993; Kishimoto et al., 2009; Liu, Zhang, & Xia, 2008). However, its exact hypocholesterolemic mechanism remains unclear. MD is a non-viscous soluble dietary fibre that has been reported to reduce plasma lipids, probably by delaying lipid absorption (Kishimoto et al., 2009; Nagata & Saito, 2006). CH is an *N*-acetyl-glucosamine obtained from the deacetylation of chitin. It can reduce fat absorption and interrupt enterohepatic bile acid circulation (Aranaz et al., 2009). CH differs from other dietary fibres as it has cationic characteristics. Consequently, adsorption has been proposed as the main mechanism responsible for its hypolipidemic properties, binding fatty acids, neutral sterols and bile acids by electrostatic and hydrophobic forces (Ikeda et al., 1993). Therefore, it is questionable whether this cationic characteristic makes CH able to selectively bind fat components.

The main aim of this report was therefore to study the selective fat-binding capacity of CH and its effects on fatty acid absorption and on neutral sterol and bile acid excretion. In order to ascertain the fat-binding mechanism of CH, a longitudinal study was conducted and the results were compared with those of MD, which was taken as an example of a soluble fibre. The guinea pig was chosen as a suitable animal model as it has more similarities with human lipid metabolism than other more commonly used experimental animals, such as rats or hamsters (Fernandez & Volek, 2006).

2. Material and methods

2.1. Materials

Ninety-nine percent or higher fatty acid methyl ester (FAME) standard oleic acid (C18:1 $n-9$), linolenic acid (C18:3 $n-3$) and heneicosanoate acid (C21:0) were purchased from Larodan Fine Chemical AB (Malmö, Sweden). The rest of the FAME standards, bile acids, Sylon BTZ (3:2:3, BSA + TMCS + TMSI) and anhydrous pyridine were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sterol standards were supplied by Steraloids (Newport, Rhode Island, USA).

Sodium methylate 0.5 N was prepared by dissolving 17 g of sodium in 1 l of dry methanol. *n*-Hexane and boron trifluoride (20% in anhydrous methanol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Chloroform, cyclohexane, methanol and diethyl ether were purchased from Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, Spain), while sodium chloride and anhydrous sodium sulphate were bought from Panreac (Barcelona, Spain). All solvents and reagents were analytical grade or higher and bidistilled water was used throughout the study.

2.2. Diets

Three isocaloric diets were prepared by Teklan Harlan (Madison, WI). They were designed to meet all the nutritional requirements of the guinea pigs. The composition of the diets was equal, except for the fibre source (Table 1). The fibre used in the control group was cellulose (Teklan Harlan, Madison, WI). The fibre sources of the experimental diets were commercially available MD (Fibersol-2b™) from Matsutani Chemical Industry Co. Ltd.

Table 1

Composition of diets fed to guinea pigs.

Component	CE ⁴ (g/100g)	MD (g/100g)	CH (g/100g)	Energy (%)
Protein	18.1	18.1	18.1	18.0
Fat mix ¹	16.9	16.9	16.9	37.9
Sugars ²	44.3	44.3	44.3	44.1
Mineral mix ³	4.6	4.6	4.6	
Vitamin mix ³	1.0	1.0	1.0	
Cellulose	12.0			
Fibersol-2b™		12.0		
Chitosan			12.0	

¹ Fat mix contains olive oil/palm kernel oil/safflower oil (1:2:1.8).

² Added as cornstarch/sucrose (1:1.43).

³ Mineral and vitamin mix were adjusted to meet National Research Council requirements for guinea pigs. Mineral mix composition (g/100 g): calcium phosphate 38.7, potassium acetate 29.9, calcium carbonate 9.2, magnesium oxide 9.2, potassium chloride 7.4, sodium chloride 3.7, ferric citrate 1.1, manganese sulphate, monohydrate 0.6, zinc carbonate 0.203, cupric sulphate 0.055, potassium iodate 0.002, chromium potassium sulphate, dodecahydrate 0.018, sodium selenite, pentahydrate 0.002, ammonium paramolybdate, tetrahydrate 0.006. Vitamin mix composition (g/100 g): *p*-aminobenzoic acid 1.10, vitamin-C (ascorbic acid) 10.17, biotin 0.004, vitamin B₁₂ (0.1% in mannitol) 0.30, calcium pantothenate 0.66, choline dihydrogen citrate 34.97, folic acid 0.02, inositol 1.10, vitamin K₃, menadione 0.50, pyridoxine HCl 0.99, niacin 0.22, riboflavin 0.22, thiamin HCl 0.22, vitamin A palmitate (500,000 IU/g) 0.40, vitamin D₃, cholecalciferol (500,000 IU/g) 0.04, vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g) 2.42, corn starch 46.67.

⁴ CE, cellulose; MD, digestion-resistant maltodextrin; CH, chitosan.

(Hyogo, Japan) and CH (Chitoclear™ 94% deacetylation degree and 23 mPa s diluted at 1% concentration in 0.1 M acetic acid) from Primex Chemicals (Siglufjordur, Iceland).

The fat mix in the diets was olive oil/palm-kernel oil/safflower oil (1:2:1.8). The concentration of fatty acids was the same in all diets: lauric acid (C12:0), 27.71; myristic acid (C14:0), 9.91; palmitic acid (C16:0), 13.87; margaric acid (C17:0), 0.11; stearic acid (C18:0), 13.79; arachidic acid (20:0), 0.51; behenic acid (C22:0), 0.42; lignoceric acid (C24:0), 0.26; oleic acid (C18:1 $n-9$), 19.09, *cis*-vaccenic acid (C18:1 $n-7$), 1.36; linoleic acid (C18:2 $n-6$), 62.62 and α -linolenic acid (C18:3 $n-3$), 2.64 in mg per g of diet. The $n-6/n-3$ ratio was particularly high at 23.75. The sterol composition of diets was as follows: cholesterol, 0.39; campesterol, 0.09; β -sitosterol, 0.21; and sitostanol, 0.06 in mg per g of diet.

2.3. Animals

All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona. Dunkin Hartley female guinea pigs were supplied by Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain). Animals weighing 300–400 g were randomly assigned to the treatment groups (8 animals/group) after 1 week of acclimation. Two guinea pigs were kept in each stainless steel cage. Cages were wire-bottomed to avoid coprophagia. Animals were housed in a room with a controlled light cycle (light from 08:00 to 20:00 h) at 22 ± 1 °C for 4 weeks of treatment. Food and water were consumed *ad libitum*. Every 2 days, faeces were collected, the animals were weighed and food consumption was controlled. Faeces were manually cleaned of sawdust contamination, weighed, homogenised, freeze-dried and stored at –20 °C.

2.4. Determination of fatty acid content in faeces and diets

The method for the analysis of fatty acids (FA) was based on a modification of the method proposed by López-López et al. (2000) which allows the determination of fatty acids present in whether esterified or free form. First, 70–80 mg of samples were weighed in tubes containing 1 mg of heneicosanoate acid (C21:0) as an internal standard. The samples were saponified with 2 ml of sodium methylate 0.5 N and heated in a boiling water bath for

4.3. EFECTO DE LA GOMA GUAR PARCIALMENTE HIDROLIZADA, LA MALTODEXTRINA RESISTENTE A LA DIGESTIÓN Y EL QUITOSANO EN EL CONTENIDO LIPÍDICO Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASMA E HÍGADO DE COBAYAS

Jonathan Santas, Jordi Cuñé Magda Rafecas

En proceso de revisión

Resumen

En el presente estudio se comparó la capacidad hipolipidémica *in vivo* de dos fibras goma guar parcialmente hidrolizadas (PHGG), una maltodextrina resistente a la digestión (MD) y quitosano (CH). Durante 4 semanas se alimentaron cobayas (n=8 animales por grupo) con dietas ricas en grasa que contenían 12 g/100 g de celulosa (CE) como control negativo, goma guar parcialmente hidrolizada durante 1 hora (PHGG1), goma guar parcialmente hidrolizada durante 2 horas (PHGG2), MD o CH. Al final del estudio se determinó el contenido lipídico y el perfil de ácidos grasos (AG) en plasma y en hígado. Todas las fibras experimentales redujeron el colesterol total en plasma y mejoraron el índice ateroesclerótico HDL/LDL. El CH fue la fibra más eficiente reduciendo la hipertrofia del hígado y su concentración de colesterol. Entre las fibras estudiadas sólo el CH modificó el perfil de AG tanto en plasma como hígado. El CH alteró la relación entre ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-6/n-3 tanto en plasma como hígado, mientras que la relación entre ácidos grasos saturados (AGS) e insaturados (AGI) permaneció inalterada. Estos resultados sugieren que el CH podría tener efectos interesantes a la hora de disminuir los efectos adversos asociados a dietas con una elevada relación AGPI n-6/n-3.

Effect of partially hydrolyzed guar gum, digestion-resistant maltodextrin and chitosan on plasma and liver lipid content and fatty acid profile in guinea pigs

Jonathan Santas^{a,b} and Magda Rafecas^{a*}

^a Department of Nutrition and Food Science, XaRTA-INSA, University of Barcelona, 08028, Barcelona, Spain

^b AB-Biotics, S.A., Parc Tecnològic del Vallès, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

* Corresponding author: M.Rafecas

Tel: (+34) 934034841, Fax: (+34) 934035931.

E-mail: magdarafecas@ub.edu

Abbreviations

CE	Cellulose
FA	Fatty acid(s)
FAME	Fatty acid methyl ester(s)
HDL	High density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
MD	Digestion-resistant maltodextrin
MUFA	Monounsaturated fatty acid(s)
PHGG	Partially hydrolyzed guar gum(s)
PHGG1	Partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis)
PHGG2	Partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis)
PUFA	Polyunsaturated fatty acid(s)
SEM	Standard error of the mean
SFA	Saturated fatty acid (s)
TAG	Triglycerides
TSFA	Total saturated fatty acids
TUFA	Total unsaturated fatty acids
UFA	Unsaturated fatty acid(s)

Abstract

This study compared the *in vivo* hypolipidemic effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG), digestion-resistant maltodextrin (MD) and chitosan (CH). Guinea pigs (n=8 animals per group) were fed for 4 weeks with high-fat isocaloric diets containing 12 g/ 100 g of cellulose (CE) as negative control, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis, PHGG1), partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis, PHGG2), MD or CH. Plasma and liver lipids and fatty acid (FA) profile were determined at the end of the study. All the experimental fibers reduced total and LDL cholesterol in plasma and improved the ratio of HLD/LDL. CH resulted more efficient than the other fibers reducing liver hypertrophy and its concentration of cholesterol. Among the studied dietary fibers only CH was able to modify the FA profile of both plasma and liver. CH consumption resulted in a reduction of the ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in both plasma and liver, whereas the ratio of saturated fatty acids (SFA) to unsaturated fatty acids (UFA) remained unaltered. These results suggest that CH may be of interest for ameliorating the adverse effects associated to diets with high n-6/n-3 ratios.

Keywords: dietary fiber, partially hydrolyzed guar gum, digestion-resistant maltodextrin, chitosan, cardiovascular heart disease, cholesterol, fatty acids.

1. Introduction

The prevalence of cardiovascular heart disease (CHD) has increased rapidly worldwide, acquiring epidemic proportions in industrialized countries (World Health Organization (WHO), 2011d). Excess of calories and fats are known to be major contributing factors of its etiology and therefore a reduction of dietary fat intake is proposed as a primary treatment (Lloyd-Jones et al., 2010b). In addition, fat quality can also modulate cardiovascular outcomes (Erkkila et al., 2008). Evidence accumulated over the past several decades shows a positive correlation between dietary intake of *trans* and saturated fatty acids (SFA), mainly those of 12-16 carbons, and an increase of cardiovascular risk (Erkkila et al., 2008; Fernandez & West, 2005). Conversely, monounsaturated fatty acids (MUFA)

and both n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) seem to be cardioprotective (Erkkila et al., 2008; Moreno & Mitjavila, 2003). In addition, based on different studies suggesting that linoleic acid and other n-6 fatty acids (FA) may be proinflammatory and prothrombotic, some authors have suggested that n-6 PUFA intake should be decreased and n-3 intake increased (Chilton et al., 2008; Simopoulos, 2002).

The hypolipidemic effect of dietary fiber has been reported by many investigators (Anderson et al., 2009; Viuda-Martos et al., 2010). The beneficial effects of fiber consumption on plasma and liver lipids have been mainly attributed to the capacity of high-viscous soluble dietary fibers to reduce the digestion and absorption of lipids (Chutkan et al., 2012). However, non-viscous dietary fibers have also been reported to exert hypolipidemic effects. Partially hydrolyzed guar gum (PHGG), with a significantly lower viscosity of native guar gum, has been reported to reduce dietary FA and neutral sterol absorption independently of its viscosity (Minekus et al., 2005; Santas et al., 2012a). Likewise, digestion-resistant maltodextrin (MD) is a soluble dietary fiber that do not form a gel in the digestive tract and which has been proposed to promote lipid excretion (Kishimoto et al., 2009).

Chitosan (CH) is an *N*-acetyl-glucosamine obtained from the deacetylation of chitin which can decrease fat absorption by different mechanisms (Aranaz et al., 2009). CH differs from other dietary fibers in its unique cationic characteristics, which may allow CH to bind FA, neutral sterols and bile acids by electrostatic forces (Ikeda et al., 2001). In our recent study we reported a selective increase of the excretion of FA by CH (Santas et al., 2012b) in contrast to MD and PHGG (Santas et al., 2012a). As a result, CH can decrease the ratio of SFA to unsaturated fatty acids (UFA) in faeces due to a higher affinity to bind MUFA and PUFA than long chain SFA. Interestingly, the n-6/n-3 PUFA ratio in faeces was altered by CH because it led to a greater increase in the excretion of n-6 than n-3 isomers. However, it remains to be determined whether this selective fat-binding capacity may affect plasma and liver composition, which can be of great interest as it is well known that FA elicits different metabolic responses. For instance, both TSFA/TUFA and n-6/n-3 ratios are

closely related with different atherosclerosis risk factors due to their direct implication in lipoprotein metabolism and inflammation (Bruckner, 2007).

Therefore, the present study was undertaken to compare the *in vivo* effect of dietary fibers with different hypolipidemic mechanisms and to ascertain whether the effects previously observed on lipid excretion, especially FA, may affect the composition of plasma and liver lipids.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Fatty acid methyl ester (FAME) standards were of 99% or higher purity. Oleic acid (C18:1n-9), linolenic acid (C18:3n-3) and heneicosanoate acid (C21:0) were purchased from Larodan Fine Chemical AB (Malmö, Sweden). The rest of the FAME standards were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Sodium methylate 0.5N was prepared by dissolving 17 g of sodium in 1 L of dry methanol. *N*-hexane and boron trifluoride (20% in anhydrous methanol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Chloroform, diethyl ether and methanol were purchased from Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, Spain), while sodium chloride and anhydrous sodium sulphate were bought from Panreac (Barcelona, Spain). All solvents and reagents were analytical grade or higher and double deionized water was used throughout the study.

2.2. Dietary fiber sources

Cellulose was purchased from Teklan Harlan (Madison, WI, USA). Two partially hydrolyzed guar gums (PHGG) were obtained by chemical hydrolysis of guar gum from *Cyamopsis tetragonoloba* with H₂O:EtOH (1:1) for 1h (PHGG1) or 2h (PHGG2) as previously described (Santas et al., 2012a). The resulting viscosity of 1% aqueous dispersions of PHGG1 and PHGG2 determined using a First RM Rheometer from Lamy Rheometers (Champagne au Mont d'Or, France) at a shear rate of 10⁻¹s were 1285 and 766 mPa·s, respectively. Digestion-resistant maltodextrin (MD, Fibersol-2bTM) was purchased from Matsutani Chemical Industry Co. Ltd (Hyogo, Japan) and chitosan (CH, ChitoclearTM 94%

deacetylation degree and 23 mPa·s diluted at 1% concentration in 0.1M acetic acid) from Primex Chemicals (Siglufjordur, Iceland)

2.2. Diets

Five isocaloric diets were prepared by Teklan Harlan (Madison, WI, USA). They were designed to meet all the nutritional requirements of the guinea pigs. The composition of the diets was equal, except for the fiber source as each diet contained one of the dietary fibers described above (**Table 1**). The fat mix content of diets was olive oil/palm-kernel oil/safflower oil (1:2:1.8). The detailed FA and sterol composition of diets is shown in **Table 2**.

2.3. Animals

All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona. Dunkin Hartley female guinea pigs were supplied by Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain). Guinea pig was used as a model organism to allow a better extrapolation to the human situation due to its high resemblance to the human lipid metabolism (Fernandez & Volek, 2006). Animals (weighing 300-400 g) were housed in stainless steel cages (2 animals per cage), which were wire-bottomed to avoid coprophagia. Animals were housed in a room with a controlled light cycle (light from 08:00 to 20:00 h) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. After one week of acclimation, animals were randomly assigned to the dietary treatment groups (8 animals/group). Food and water were consumed *ad libitum*. Body weight and food consumption was recorded with 2-day periodicity. After 28 days (for weeks) non-fasted guinea pigs were anesthetised with isoflurane and killed by heart puncture. Blood samples were collected in heparinized tubes and plasma was separated after centrifugation at 1500g during 15 min at 4°C and stored at -80°C . Livers were excised, weighted, homogenized and stored at -80°C .

2.4. Determination of plasma lipids.

Total, HDL and LDL-cholesterol and triglycerides (TAG) were enzymatically determined with a Modular DPE Hitachi auto-analyzer from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Plasma FA were determined as follow: six hundred microlitres of plasma was added to a tube containing 50 μ L of internal standard (C21:0, 1 mg/mL). The extraction was performed with 20 mL of chloroform:methanol (2:1) for 45 min with continuous magnetic stirring. The extract was filtered through a Whatman No. 1 and the residue was re-extracted twice with 10 mL of the same solvent for 1 min. After addition of 10 mL of NaCl 1% (w/v), tubes were shaken and centrifuged for 20 min at 540g. Chloroform phase was filtered through anhydrous sodium sulfate (Whatman No. 1 filter paper) which was subsequently washed with 5 mL of chloroform: methanol (2:1) and twice with 5 mL of chloroform. Solvent was evaporated in a vacuum rotatory evaporator at 30°C and allowed to dry at vacuum desiccator for 2h. Lipids were transferred from flasks to tubes with diethyl ether that was finally evaporated with slight nitrogen stream at 30°C. Tubes were allowed to dry overnight in a vacuum desiccator. The FAME were obtained by incubating the samples in a boiling bath with 1 mL of sodium methylate 0.5N for 20 minutes and 1 mL of boron trifluoride (20% in anhydrous methanol) for 15 minutes. Then, 2 mL of *n*-hexane was added and tubes shaken. After addition of 1 mL of saturated sodium chloride solution, tubes were shaken and the clear *n*-hexane top layer was transferred to another tube containing sodium sulfate anhydrous. Samples were allowed to dry for 2 hours and 1 mL of the extract was transferred to another tube and concentrated to 150 μ L by nitrogen flux at 30°C. Contents were finally transferred to injection vials and stored at -20°C until injection.

2.5. Determination of liver lipids.

Liver FA were determined as follows: liver homogenates (1.5 g) were weighted in tubes containing 1.5 mg of C21:0 as internal standard. The extraction was performed with 20 mL of chloroform:methanol (2:1) using a Polytron PT3000 homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland) at 19,000-20,000 rpm for 20 s. The extract was filtered through a Whatman No. 1 and the residue extracted twice with 10 mL of the same solvent. The extract was

purified as earlier described for plasma extracts. FAME were obtained as described for plasma but using 2.5 mL of sodium methylate 0.5 N, 3 mL of boron trifluoride (20% in anhydrous methanol), 3 mL of *n*-hexane and 4 mL of sodium chloride saturated solution. The *n*-hexane upper layer containing the FAME was allowed to dry for 2 hours in tubes containing sodium sulfate anhydrous and transferred to injection vials and stored at -20°C until injection.

Liver lipids for the determination of TAG and cholesterol were extracted as described above. One millilitre of 1% Triton® X-100 in methanol was added to an appropriate aliquot of the extract and the solvent evaporated to dryness under nitrogen flux at 30°C. Finally, deionized water was added and tubes were warmed for 15 min at 37°C for complete dissolution. TAG were analyzed by using an enzymatic kit from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and esterified and free cholesterol by using a kit from Biovision Inc. (Milpitas, CA, USA).

2.6. GC conditions

FAME were analyzed using an Agilent 4890D gas chromatograph (Santa Clara, CA, USA), equipped with a flame ionization detector (FID). A fused-silica capillary column (60 m x 0.25 mm i.d., 0.2 µm) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used for separation. One µL was injected in split-splitless injector with a split ratio of 1:30. The injector and detector temperatures were kept at 270°C and 300°C, respectively. Oven temperature was programmed as follows: an initial temperature of 140°C for 3 min, followed by an increase of 6°C/min to 160°C, an increase of 2°C/min to 230°C and then an increase of 6°C/min to 250°C and finally left to stand for 15 min at 250°C. Helium was used as a carrier gas and nitrogen was used as the makeup gas to increase the detector's sensibility. Chromatographic peaks were identified by comparing the retention times with those of known standards and by co-chromatography. The quantification of FAME was performed by the internal standard addition method and using calibration curves with $R^2 > 0.99$.

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed by SPSS v.17 for Windows (SPSS Inc. Chigago, IL, USA). Any significant differences among treatments were determined by one-way ANOVA and the exact nature of the differences by Duncan's multirange *post hoc* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results are expressed as means \pm SEM.

3. Results

3.1. Food intake, body and liver weight.

Food intake was monitored during the study and was the same for the five dietary groups, with average values ranging from 26 to 28 g of food animal⁻¹ day⁻¹. As shown in **Figure 1**, animals in all groups gained weight during the study. However, growth rate of animals belonging to PHGG groups was slightly lower, resulting in lower body weights compared to the CE control ($P < 0.05$), already after three weeks of treatment. Compared to CE, the relative liver weight of animals was only lower in those animals fed with CH (**Figure 2**), whereas the other dietary groups presented similar values.

3.2. Plasma lipids

Plasma TAG were not significantly altered by experimental fiber consumption, although values were slightly lower in those animals fed with CH (**Figure 3**). In contrast, PHGG1, PHGG2, MD and CH were effective reducing total plasma cholesterol compared to control CE ($P < 0.05$). Despite both LDL- and HDL-cholesterol were reduced after experimental fiber ingestion, the HDL to LDL ratio was significantly improved by PHGG1, PHGG2, MD and CH (0.13 ± 0.01 , 0.14 ± 0.02 , 0.13 ± 0.01 , 0.11 ± 0.01 , respectively) compared to CE (0.08 ± 0.01).

CH and PHGG2 were the most efficient dietary fibers reducing total plasma FA compared to control. Total FA also tended to decrease after PHGG1 and MD consumption, but differences were not statistically significant (**Table 3**). The most abundant FA in all groups was C18:2n-6 (46-38%), followed by C18:1n-9 (20-15%), C16:0 (15-13%) and C18:0 (9-8%). In general, the reduction in total FA concentration observed in CH and PHGG2 groups was accounted by changes in the concentration of almost all SFA, MUFA and PUFA.

Consequently, the ratio of TSFA to TUFA was not significantly altered. However, the ratio of n-6 to n-3 was reduced by CH compared to CE ($P < 0.05$), mainly due to a greater reduction in the concentration of C18:2n-6 compared to that of C18:3n-3.

3.3. Liver lipids

Liver total cholesterol, but not liver TAG, was significantly reduced by experimental fibers compared to CE, especially in those animals fed with CH (**Table 4**), similarly to what was found in plasma. This effect was mainly accounted by a reduction of free cholesterol pool. Among the different fibers tested, soluble fibers (either PHGG1, PHGG2 or MD) tended to increase the concentration of cholesteryl esters present in the liver leading to a higher ratio of esterified to free cholesterol compared to CE.

Only minor changes were observed on liver FA concentrations among groups (**Table 5**). In fact, the concentration of total FA, TSFA, MUFA and PUFA was not significantly altered by fiber consumption. However, as observed in plasma, the FA profile of liver was altered by CH, which significantly reduced the ratio of n-6 to n-3, but not that of TSFA to TUFA, compared to control CE.

4. Discussion

In the present study, we compared the hypolipidemic *in vivo* effect in guinea pigs of a low molecular weight chitosan and the soluble dietary fibers, namely digestion resistant maltodextrin and partially hydrolyzed guar gum. These fibers are known for their beneficial physiological effects such as reduction of fat absorption and hypocholesterolemic properties (Aranaz et al., 2009; Kishimoto et al., 2009; Yoon et al., 2008a). The hypocholesterolemic capacity of these fibers was confirmed as they were able to reduce plasma and liver cholesterol. In agreement with previously reported results (Chiang et al., 2000) animals fed with CH had also a lower liver weight than animals fed with CE. Consequently, CH was more efficient than soluble fibers preventing the liver hypertrophy caused by a high fat diet and thus, reducing the accumulation of cholesterol in the liver.

Mechanisms commonly attributed to the cholesterol-lowering capacity of dietary fiber include impairment of cholesterol absorption and especially, conversion of hepatic cholesterol to bile acids (Viuda-Martos et al., 2010). In our preliminary studies, we showed that consumption of PHGG (Santas et al., 2012a) and MD (Santas et al., 2012b) increased the excretion of neutral sterols. CH increased the excretion of neutral sterols as well as bile acids (Santas et al., 2012b) which can explain the higher beneficial effect of CH on liver and plasma cholesterol levels.

The effect of the studied fibers on lipid excretion can be ascribed to different mechanisms. PHGG is a soluble fiber with a significantly lower viscosity than native gum guar (Yoon et al., 2008a). It has been reported that a reduction of its viscosity is not correlated with losses of its hypolipidemic capacity, which suggests that complementary mechanisms other than viscosity may be present (Santas et al., 2012a; Yoon et al., 2008a). For instance, it is likely that PHGG reduces the emulsifying effect of bile acids by favouring the flocculation of fat droplets, which leads to a reduction of fat and cholesterol bioaccessibility (Minekus et al., 2005). Besides, MD is a non-viscous soluble fiber with no effect on lipase activity, which decreases lipid absorption by delaying the release of lipids from micelles (Kishimoto et al., 2009). Therefore, these soluble fibers do not exert a selective effect on FA absorption as the mechanisms underlying their hypolipidemic effect are associated with a general increase of dietary fat excretion (Santas et al., 2012a; Santas et al., 2012b).

On the other hand, CH is a polymer with unique cationic characteristics that has been shown to have selective fat-binding capacity (Santas et al., 2012b). At the acidic pH of the stomach, the free amino groups of CH are positively charged, which allows CH to interact by electrostatic forces with sterols and FA in the digestive tract (Deuchi et al., 1995a; Liu et al., 2008). In our previous report (Santas et al., 2012b), we showed that long chain SFA (C16:0-C24:0) were less susceptible to the effect of CH than SFA with shorter hydrocarbon chains (C12:0 and C14:0), MUFA and PUFA. As a result, the TSFA/TUFA ratio in faeces was greatly decreased. Among PUFA, CH also altered the n-6/n-3 ratio due to a greater excretion of n-6 FA than n-3 FA. In the present study, we examined whether this selective

effect on FA absorption could elicit significant changes in the FA profile of plasma and liver, which can be of great interest due to its repercussion on different cardiovascular disease risk factors. In contrast to our observations on FA excretion (Santas et al., 2012b), and despite the reduction of the concentration of plasma FA caused by CH consumption, the TSFA/TUFA ratio was altered neither in plasma nor in liver. However, the n-6/n-3 ratio in both plasma and liver was significantly reduced when animals were fed with CH, as compared to CE and the soluble fibers, fact that was mainly due to a reduction of the relative concentration of C18:2n-6. In a recent study, Abbot et al. (Abbott et al., 2012) reported the effect of several diets, representing a wide range of FA profiles, on the FA composition of different tissues. The authors concluded that plasma and liver were less influenced by changes in FA profile compared to other tissues such as skeletal muscle and adipose tissue. In fact, the TSFA/TUFA ratio, was closely regulated in plasma and liver over a large variation in the FA composition of the diet. In contrast, the n-6/n-3 ratio was more responsive to dietary changes. Besides, one of the most exhaustive reviews until today (Hodson et al., 2008) reveals that the correlations between the dietary intake of SFA and MUFA and their concentration in plasma are generally weaker and more inconclusive than those of specific PUFA and the n-6/n-3 ratio. A possible explanation for these observations is a mechanism known as 'homoviscous adaptation', which is a homeostatic process that regulates the balance of SFA and UFA in membranes to maintain an optimal fluidity (Sinensky, 1974). Since C18:2n-6 and C18:3n-3 PUFA have been shown to be independent essential fatty acids, their *in vivo* concentration as well as that of their respective long-chain PUFA is much more influenced by their dietary intake. These observations would explain the lack of effect of CH on the TSFA/TUFA ratio and the greater influence on the n-6/n-3 ratio in plasma and liver, despite the selective effect of CH on FA excretion (Santas et al., 2012b).

In the last decade, a considerable concern with regard to the importance of improving the n-6/n-3 PUFA ratio in the human diet has arisen. Despite it is not devoid of controversy (Fritsche, 2008; Harris et al., 2009), substantial evidence supports that a high n-6/n-3 ratio can lead to a higher production of pro-inflammatory eicosanoids which might promote the

pathogenesis of cardiovascular, inflammatory and autoimmune disorders (Chilton et al., 2008; Simopoulos, 2006). Therefore, our results suggest that CH may be of interest for ameliorating the adverse effects associated to diets with high n-6/n-3 ratios. In fact, CH has been recently reported to exert anti-inflammatory effect *in vivo* (Chung et al., 2012). However, the clinical relevance of CH regarding this aspect remains to be determined and further research is necessary.

5. Conclusions

In conclusion, the present study confirms the *in vivo* hypocholesterolemic capacity of PHGG, independently of its viscosity, as well as that of MD and CH. Moreover, CH consumption can alter the FA acid profile of both plasma and liver. These changes are ascribed to a reduction of the ratio of n-6 to n-3 PUFA, but not that of TSFA to TUFA. Therefore, the results reveal that CH may be of interest in the prevention of the adverse effects associated to diets with a high n-6/n-3 ratio.

Further research would allow determining whether different factors such as the FA profile of diets and/or the physicochemical properties of CH (i.e. deacetylation degree and/or viscosity) may influence the *in vivo* effect of CH on the FA profiles of different tissues.

Acknowledgements

The authors thank A. Aldanondo and S. Scapucci for their support during sample analysis, and Dr. A. Tres for her technical comments on the manuscript. J. Santas was granted a Torres Quevedo fellowship.

Tables

Table 1: Composition of diets fed to guinea pigs

Table 2: Fatty acid and sterol composition of diets fed to guinea pig

Table 3: Plasma fatty acids

Table 4: Liver lipids

Table 5: Liver fatty acids

Figures

Figure 1: Body weight during the study

Figure 2: Liver weight

Figure 3: Plasma lipids

References

- Abbott, S. K., Else, P. L., Atkins, T. A., & Hulbert, A. J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(5), 1309-1317.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr., R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, 67(4), 188-205.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., & Heras, Á (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.
- Bruckner, G. (2007). Fatty Acids and Cardiovascular Disease. In C. Kuang, *Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Third Edition* (pp. 1061-1084). CRC Press.
- Chiang, M. -, Yao, H. -, & Chen, H. -. (2000). Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(5), 965-971.
- Chilton, F. H., Rudel, L. L., Parks, S. P., Arm, J. P., & Seeds, M. C. (2008). Mechanisms by which botanical lipids affect inflammatory disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 498S.
- Chung, M. J., Park, J. K., & Park, Y. I. (2012). Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *International immunopharmacology*, 12(2), 453-459.
- Chutkan, R., Fahey, G., Wright, W. L., & Mcorrie, J. (2012). Viscous versus nonviscous soluble fiber supplements: Mechanisms and evidence for fiber-specific health benefits. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 24(8), 476-487.

- Deuchi, K., Kanauchi, O., Imasato, Y., & Kobayashi, E. (1995). Effect of the viscosity or deacetylation degree of chitosan on fecal fat excreted from rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(5), 781-785.
- Erkkila, A., de Mello, V. D. F., Riserus, U., & Laaksonen, D. E. (2008). Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Progress in lipid research*, 47(3), 172-187.
- Fernandez, M. L., & West, K. L. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *The Journal of Nutrition*, 135(9), 2075.
- Fernandez, M. L., & Volek, J. S. (2006). Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutrition & Metabolism*, 3(17).
- Fritsche, K. L. (2008). Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it? *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3-5), 173-175.
- Harris, W. S., Mozaffarian, D., Rimm, E., Kris-Etherton, P., Rudel, L. L., Appel, L. J., Engler, M. M., Engler, M. B., & Sacks, F. (2009). Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: A science advisory from the American Heart Association nutrition subcommittee of the council on nutrition, physical activity, and metabolism; council on cardiovascular nursing; and council on epidemiology and prevention. *Circulation*, 119(6), 902-907.
- Hodson, L., Skeaff, C. M., & Fielding, B. A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in lipid research*, 47(5), 348-380.
- Ikeda, I., Nakagiri, H., Sugano, M., Ohara, S., Hamada, T., Nonaka, M., & Imaizumi, K. (2001). Mechanisms of phytosterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive and WKY rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 50(11), 1361-1368.
- Kishimoto, Y., Yoshikawa, Y., Miyazato, S., Oga, H., Yamada, T., Tagami, H., Hashizume, C., & Kunio, Y. (2009). Effect of resistant maltodextrin on digestion and absorption of lipids. *Journal of Health Science*, 55(5), 838-844.

- Liu, J., Zhang, J., & Xia, W. (2008). Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 107(1), 419.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D., & Wylie-Rosett, J. (2010). Heart disease and stroke statistics - 2010 update: A report from the American heart association. *Circulation*, 121(7), 948-954.
- Minekus, M., Jelier, M., Xiao, J. Z., Kondo, S., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Bos, M., Dunnewind, B., & Havenaar, R. (2005). Effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on the bioaccessibility of fat and cholesterol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(5), 932.
- Moreno, J. J., & Mitjavila, M. T. (2003). The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(4), 182-195.
- Santas, J., Espadaler, J., Cuñé, J., & Rafecas, M. (2012a). Partially hydrolyzed guar gums reduce dietary fatty acid and sterol absorption in guinea pigs independent of viscosity. *Lipids*, 47(7), 697-705.
- Santas, J., Espadaler, J., Mancebo, R., & Rafecas, M. (2012b). Selective in vivo effect of chitosan on fatty acid, neutral sterol and bile acid excretion: A longitudinal study. *Food Chemistry*, 134(2), 940-947.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine pharmacotherapy*, 60(9), 502.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 56(8), 365.

- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(2), 522-525.
- Viuda-Martos, M., López-Marcos, M. C., Fernández-López, J., Sendra, E., López-Vargas, J. H., & Perez-Álvarez, J. A. (2010). Role of fiber in cardiovascular diseases: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 240-258.
- World Health Organization (WHO) (2011). Cardiovascular Diseases: Fact sheet N°317. , 2011.
- Yoon, S. -, Chu, D. -, & Juneja, L. R. (2008). Chemical and physical properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42(1), 1-7.

Table 1: Composition of diets fed to guinea pigs

	CE	PHGG1	PHGG2	MD	CH	Energy
						g/100g
						%
Protein	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.0
Fat Mix ¹	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	37.9
Sugars ²	44.3	44.3	44.3	44.3	44.3	44.1
Mineral Mix ³	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	
Vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
Cellulose	12.0					
Guar gum (1-h hydrolysis)		12.0				
Guar gum (2-h hydrolysis)			12.0			
Fibersol-2 TM				12.0		
Chitosan					12.0	

¹ Fat mix contains olive oil/palm kernel oil/safflower oil (1:2:1.8)

² Added as cornstarch/sucrose (1:1.43)

³ Mineral and vitamin mix were adjusted to meet National Research Council requirements for guinea pigs. Mineral mix composition (g/100 g of mineral mix): calcium phosphate 38.7, potassium acetate 29.9, calcium carbonate 9.2, magnesium oxide 9.2, potassium chloride 7.4, sodium chloride 3.7, ferric citrate 1.1, manganese sulphate, monohydrate 0.6, zinc carbonate 0.203, cupric sulphate 0.055, potassium iodate 0.002, chromium potassium sulphate, dodecahydrate 0.018, sodium selenite, pentahydrate 0.002, ammonium paramolybdate, tetrahydrate 0.006. Vitamin mix composition (g/100 g of vitamin mix): p-aminobenzoic acid 1.10, vitamin C (ascorbic acid) 10.17, biotin 0.004, vitamin B₁₂ (0.1% in mannitol) 0.30, calcium pantothenate 0.66, choline dihydrogen citrate 34.97, folic acid 0.02, inositol 1.10, vitamin K₃, menadione 0.50, pyridoxine HCl 0.99, niacin 0.22, riboflavin 0.22, thiamin HCl 0.22, vitamin A palmitate (500,000 IU/g) 0.40, vitamin D₃, cholecalciferol (500,000 IU/g) 0.04, vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g) 2.42, corn starch 46.67.

Abbreviations: CE, cellulose; PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis); PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2TM); CH, chitosan (ChitoclearTM).

Table 2: Fatty acid and sterol composition of diets fed to guinea pig

	CE	PHGG1	PHGG2	MD	CH
<i>Fatty acid</i>			<i>mg/g</i>		
C12:0	28.55 ± 1.48	26.99 ± 0.41	28.49 ± 0.53	26.61 ± 0.28	27.97 ± 0.31
C14:0	10.20 ± 0.50	9.77 ± 0.11	10.11 ± 0.18	9.51 ± 0.11	10.01 ± 0.13
C16:0	14.25 ± 0.70	13.64 ± 0.13	14.19 ± 0.24	13.27 ± 0.17	13.94 ± 0.24
C17:0	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00
C18:0	14.20 ± 0.72	13.56 ± 0.09	14.32 ± 0.26	13.30 ± 0.19	13.89 ± 0.25
C20:0	0.52 ± 0.02	0.50 ± 0.00	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.01
C22:0	0.43 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.43 ± 0.01
C24:0	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.01
TSFA	68.54 ± 3.44	65.24 ± 0.76	68.42 ± 1.13	63.93 ± 0.76	67.12 ± 0.91
C18:1n-9	19.93 ± 0.92	18.69 ± 0.12	19.19 ± 0.41	18.17 ± 0.19	19.18 ± 0.31
C18:1n-7	1.40 ± 0.06	1.33 ± 0.01	1.36 ± 0.03	1.28 ± 0.01	1.38 ± 0.01
MUFA	21.33 ± 0.97	20.02 ± 0.13	20.55 ± 0.43	19.46 ± 0.20	20.56 ± 0.32
C18:2n-6	64.89 ± 3.11	61.41 ± 0.54	63.58 ± 1.30	59.65 ± 0.58	63.31 ± 0.94
C18:3n-3	2.73 ± 0.13	2.58 ± 0.03	2.69 ± 0.05	2.51 ± 0.03	2.66 ± 0.04
PUFA	67.62 ± 3.24	63.99 ± 0.57	66.26 ± 1.36	62.17 ± 0.60	65.98 ± 0.98
TUFA	88.95 ± 4.20	84.01 ± 0.70	86.82 ± 1.78	81.62 ± 0.80	86.53 ± 1.29
Ratio of TSFA/TUFA	0.77 ± 0.00	0.78 ± 0.00	0.79 ± 0.01	0.78 ± 0.00	0.78 ± 0.00
Ratio of n-6/n-3	23.74 ± 0.03	23.80 ± 0.05	23.68 ± 0.03	23.74 ± 0.03	23.77 ± 0.01
<i>Sterols</i>			<i>mg/100g</i>		
Cholesterol	38.57 ± 0.02	38.35 ± 0.48	39.51 ± 0.76	38.88 ± 1.11	39.77 ± 0.95
Campesterol	8.85 ± 0.03	8.63 ± 0.24	7.86 ± 0.20	8.80 ± 0.24	8.46 ± 0.13
Beta-Sitosterol	21.18 ± 0.37	20.71 ± 0.43	21.37 ± 0.52	20.35 ± 0.71	21.58 ± 0.72
Sitostanol	6.11 ± 0.69	5.33 ± 0.43	4.20 ± 0.45	5.67 ± 0.34	6.08 ± 0.37

Results expressed as means ± SEM for quadruplicated analysis. No statistical differences were found among treatments ($P > 0.1$)

Abbreviations: CE, cellulose; PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis); PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2™); CH, chitosan (Chitoclear™); TSFA, total saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids.

Table 3: Plasma fatty acids

	CE		PHGG1		PHGG2	MD		CH
C12:0	4.94±	0.68	4.25±	0.62	4.60±0.92	6.76±	1.56	3.46± 0.42
C14:0	6.87±	0.93	5.91±	0.61	5.57±0.76	7.12±	0.93	4.45± 0.46
C16:0	22.65±	3.82 ^b	18.69±	2.01 ^{ab}	12.71±1.42 ^{ab}	15.91±	1.81 ^{ab}	11.68± 0.87 ^a
C17:0	0.40±	0.05 ^{abc}	0.53±	0.06 ^c	0.32±0.05 ^{ab}	0.46±	0.07 ^{bc}	0.26± 0.03 ^a
C18:0	15.87±	3.57 ^b	12.33±	1.50 ^{ab}	8.12±1.38 ^a	10.11±	1.79 ^{ab}	6.35± 0.38 ^a
C20:0	0.25±	0.03 ^a	0.17±	0.02 ^{ab}	0.16±0.04 ^a	0.17±	0.03 ^{ab}	0.09± 0.01 ^a
C22:0	0.41±	0.04	0.38±	0.03	0.35±0.02	0.38±	0.04	0.30± 0.01
C24:0	0.40±	0.05	0.46±	0.09	0.33±0.05	0.29±	0.03	0.33± 0.05
TSFA	51.79±	7.84 ^c	42.72±	4.30 ^{bc}	32.16±3.96 ^{ab}	41.20±	5.77 ^{abc}	26.93± 1.88 ^a
C16:1n-7	0.46±	0.13	0.52±	0.11	0.29±0.03	0.29±	0.04	0.48± 0.07
C18:1n-9	26.51±	3.72 ^b	25.27±	3.94 ^{bc}	14.50±1.56 ^a	19.91±	3.28 ^{ab}	16.11± 1.26 ^a
C18:1n-7	1.55±	0.21 ^a	1.49±	0.18 ^b	0.96±0.09 ^a	1.19±	0.15 ^{ab}	0.81± 0.06 ^a
C20:1n-9	1.10±	0.18	0.92±	0.34	0.87±0.36	0.53±	0.13	0.71± 0.28
MUFA	29.63±	3.90 ^b	28.20±	4.21 ^b	16.61±1.61 ^a	21.92±	3.57 ^{ab}	18.12± 1.40 ^a
C18:3n-3	1.75±	0.40	1.68±	0.23	1.13±0.19	1.50±	0.32	1.06± 0.21
C22:5n-3	0.40±	0.08	0.26±	0.08	0.19±0.02	0.20±	0.04	0.28± 0.06
C22:6n-3	0.55±	0.10	0.61±	0.09	0.42±0.05	0.49±	0.08	0.65± 0.10
Total n-3	2.70±	0.54	2.55±	0.33	1.74±0.19	2.19±	0.35	1.99± 0.26
C18:2n-6	72.70±	15.29 ^c	64.71±	7.50 ^{bc}	42.09±4.33 ^{ab}	58.25±	9.09 ^{bc}	30.58± 3.44 ^a
C20:2n-6	0.70±	0.15	0.55±	0.08	0.39±0.03	0.49±	0.06	0.40± 0.04
C20:4n-6	2.42±	0.68	2.36±	0.33	1.40±0.11	1.50±	0.14	1.44± 0.11
C22:4n-6	0.38±	0.10	0.23±	0.07	0.27±0.03	0.26±	0.03	0.22± 0.03
Total n-6	76.19±	16.18 ^c	67.85±	7.90 ^{bc}	44.16±4.39 ^{ab}	60.50±	9.24 ^{bc}	32.65± 3.47 ^a
PUFA	78.89±	16.71 ^c	70.40±	8.19 ^{bc}	45.90±4.57 ^{ab}	62.69±	9.59 ^{abc}	34.64± 3.61 ^a
TUFA	108.52±	18.19 ^b	98.59±	11.83 ^b	62.51±5.91 ^a	84.61±	12.66 ^{ab}	52.76± 4.63 ^a
Total	160.31±	25.86 ^c	141.32±	16.03 ^{bc}	94.67±9.79 ^{ab}	125.81±	18.22 ^{abc}	79.69± 5.87 ^a
Ratio of TSFA/PUFA	0.49±	0.02	0.45±	0.02	0.51±0.02	0.49±	0.02	0.53± 0.05
Ratio of n-6/n-3	28.12±	1.77 ^b	27.78±	1.73 ^b	25.53±0.68 ^b	28.40±	1.70 ^{bc}	18.34± 3.10 ^a

Results are expressed as means ± SEM in mg dL⁻¹ of plasma (n=8). Results in the same row not sharing a common superscript are significantly different based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05.

Abbreviations: CE, cellulose; PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis); PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2TM); CH, chitosan (ChitoclearTM); TSFA, total saturated fatty acids;

MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids.

Table 4: Liver lipids

	CE	PHGG1	PHGG2	MD	CH
Triglycerides	4.60 ± 1.02 ^{ab}	2.51 ± 0.52 ^a	5.07 ± 1.15 ^{ab}	2.44 ± 0.37 ^a	5.22 ± 1.03 ^b
Total cholesterol	5.20 ± 0.58 ^b	4.42 ± 0.34 ^{ab}	4.29 ± 0.30 ^{ab}	4.40 ± 0.25 ^{ab}	3.81 ± 0.17 ^a
Free cholesterol (FC)	4.98 ± 0.53 ^b	3.53 ± 0.11 ^a	3.75 ± 0.22 ^a	3.73 ± 0.22 ^a	3.48 ± 0.11 ^a
Esterified cholesterol (EC)	0.22 ± 0.08 ^a	0.97 ± 0.27 ^b	0.55 ± 0.15 ^{ab}	0.66 ± 0.08 ^{ab}	0.34 ± 0.10 ^a
Ratio of EC/FC	0.04 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.08 ^{ab}	0.15 ± 0.03 ^{ab}	0.18 ± 0.02 ^b	0.10 ± 0.03 ^a

Results are expressed as means ± SEM in mg g⁻¹ of liver (n=8). Results in the same row not sharing a common superscript are significantly different based on based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05.

Abbreviations: CE, cellulose; PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis); PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2TM); CH, chitosan (ChitoclearTM).

Table 5: Liver fatty acids

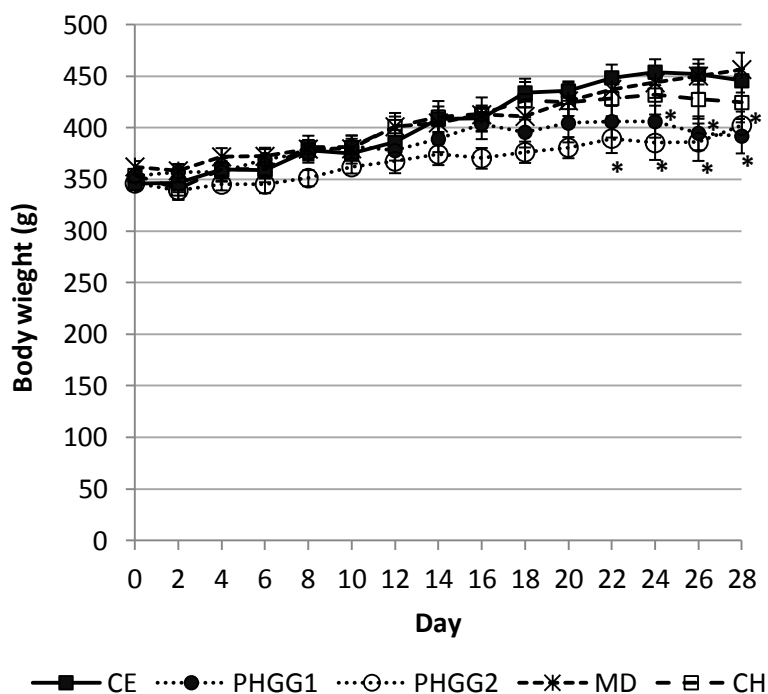
	CE	PHGG1	PHGG2	MD	CH
C12:0	0.24±0.05	0.20±0.04	0.37±0.08	0.26±0.02	0.38±0.05
C14:0	0.50±0.06 ^{ab}	0.38±0.07 ^a	0.69±0.11 ^b	0.47±0.04 ^{ab}	0.61±0.07 ^b
C16:0	1.97±0.11	1.61±0.10	1.87±0.09	1.69±0.10	1.93±0.09
C17:0	0.09±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.09±0.01
C18:0	3.08±0.26	2.78±0.17	2.55±0.24	2.72±0.32	2.59±0.16
C20:0	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
C22:0	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
C24:0	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
TSFA	5.93±0.30	5.11±0.25	5.64±0.32	5.31±0.42	5.64±0.23
C16:1n-7	0.04±0.01 ^{ab}	0.03±0.00 ^a	0.03±0.00 ^a	0.02±0.00 ^a	0.05±0.01 ^b
C18:1n-9	0.82±0.12 ^{ab}	0.57±0.07 ^a	0.60±0.06 ^a	0.61±0.06 ^a	0.87±0.10 ^b
C18:1n-7	0.48±0.03	0.43±0.02	0.49±0.03	0.44±0.03	0.41±0.03
C20:1n-9	0.03±0.00 ^{bc}	0.02±0.00 ^a	0.02±0.00 ^{ab}	0.02±0.00 ^{ab}	0.03±0.00 ^c
MUFA	1.37±0.11	1.06±0.07	1.14±0.06	1.09±0.08	1.37±0.12
C18:3n-3	0.17±0.03	0.11±0.02	0.14±0.02	0.13±0.01	0.19±0.05
C22:5n-3	0.07±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a	0.08±0.01 ^a	0.07±0.01 ^a	0.14±0.02 ^b
C22:6n-3	0.24±0.02 ^a	0.30±0.05 ^{ab}	0.26±0.04 ^a	0.23±0.02 ^a	0.45±0.09 ^b
Total n-3	0.48±0.06 ^a	0.50±0.06 ^a	0.49±0.05 ^a	0.43±0.02 ^a	0.78±0.11 ^b
C18:2n-6	7.01±0.29 ^b	5.46±0.21 ^a	6.54±0.31 ^{ab}	5.97±0.42 ^{ab}	5.38±0.55 ^a
C20:2n-6	0.22±0.02 ^b	0.16±0.01 ^a	0.22±0.01 ^b	0.18±0.02 ^{ab}	0.20±0.01 ^{ab}
C20:3n-6	0.07±0.01	0.06±0.00	0.07±0.00	0.07±0.01	0.08±0.01
C20:4n-6	1.23±0.08	1.19±0.08	1.21±0.10	1.07±0.07	1.25±0.07
C22:4n-6	0.08±0.00	0.07±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01
Total n-6	8.60±0.35 ^b	6.94±0.27 ^a	8.12±0.35 ^{ab}	7.36±0.52 ^{ab}	6.99±0.56 ^a
PUFA	9.08±0.40	7.44±0.31	8.61±0.38	7.80±0.53	7.77±0.56
TUFA	10.46±0.50	8.50±0.37	9.75±0.44	8.89±0.61	9.14±0.67
Total	16.39±0.80	13.61±0.60	15.39±0.70	14.19±1.01	14.78±0.83
Ratio of TSFA/PUFA	0.57±0.00	0.60±0.01	0.58±0.03	0.59±0.02	0.63±0.04
Ratio of n-6/n-3	18.93±1.53 ^b	15.17±1.40 ^{ab}	17.52±1.38 ^b	17.33±1.27 ^b	11.18±2.71 ^a

Results are expressed as means ± SEM in mg g⁻¹ of liver (n=8). Results in the same row not sharing a common superscript are significantly different based on based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05.

Abbreviations: CE, cellulose; CH, chitosan (Chitoclear™); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2™); PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis);

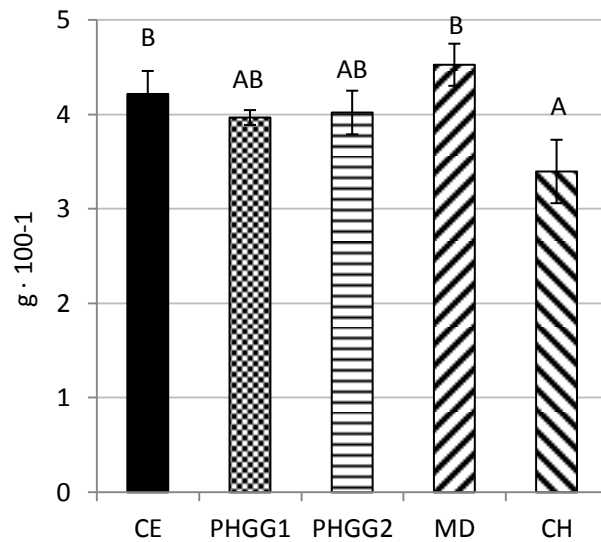
PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis); TSFA, total saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids.

Figure 1: Body weight during the study



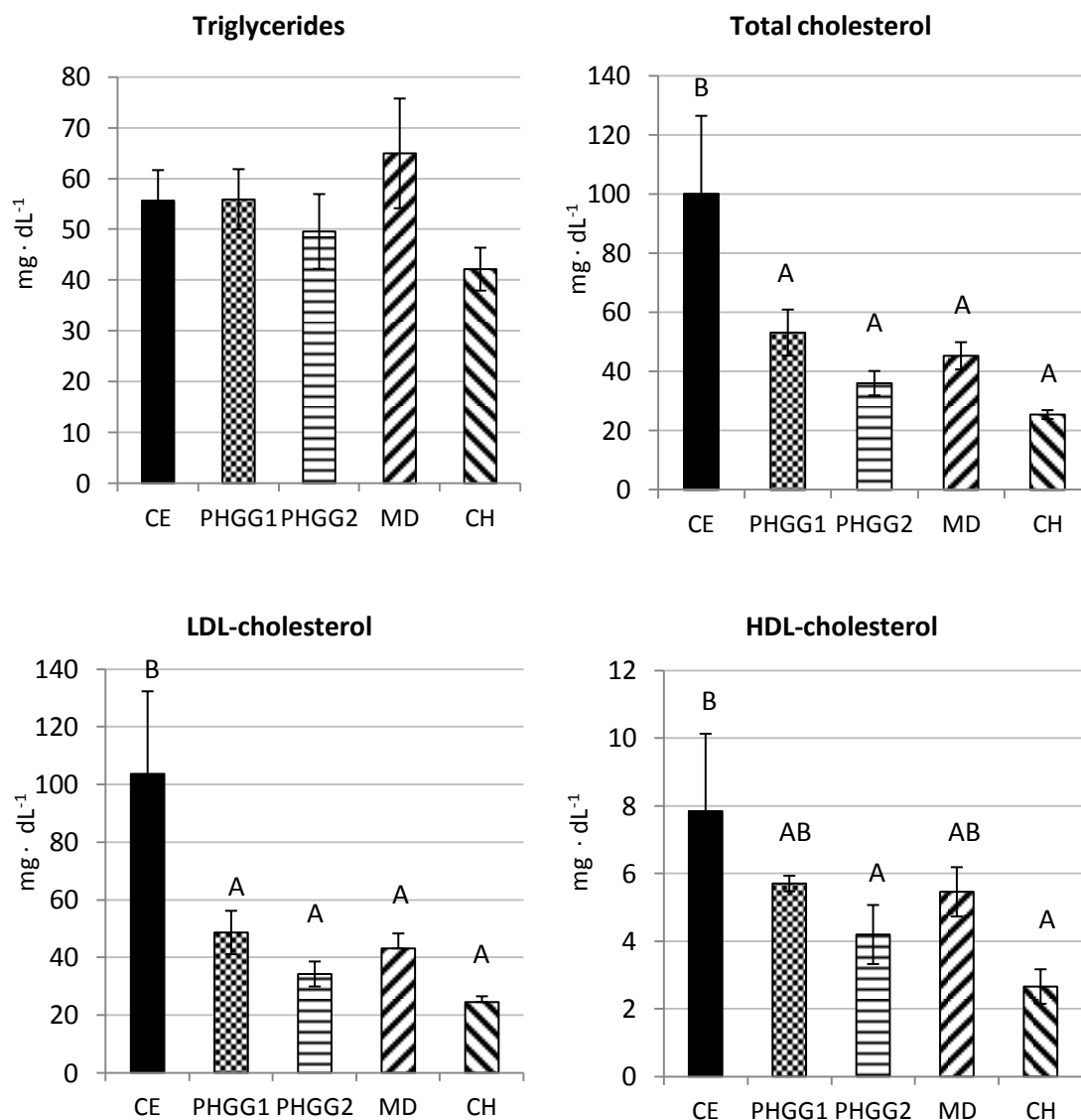
Results represent means and SEM error bars (n=8). Values presenting and asterisk (*) are statistically different from control cellulose (P<0.05).

Abbreviations: CE, cellulose; PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis); PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2™); CH, chitosan (Chitoclear™).

Figure 2: Liver weight

Results represent means and SEM error bars in g of liver (fresh weight) per 100 of animal (n=8). Results not sharing a common superscript are significantly different based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at $P < 0.05$.

Abbreviations: CE, cellulose; CH, chitosan (ChitoclearTM); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2TM); PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis); PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis).

Figure 3: Plasma lipids

Results represent means and SEM error bars in mg dL⁻¹ of plasma (n=8). Results not sharing a common superscript are significantly different based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05.

Abbreviations: CE, cellulose; PHGG1, partially hydrolyzed guar gum (1-h hydrolysis); PHGG2, partially hydrolyzed guar gum (2-h hydrolysis); MD, digestion-resistant maltodextrin (Fibersol-2™); CH, chitosan (Chitoclear™).

4.4. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOLIPIDÉMICA DE QUITOSANOS DE ALTA Y BAJA VISCOSIDAD EN COBAYAS: EFECTO SOBRE EL CONTENIDO LIPÍDICO Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASMA E HÍGADO.

Jonathan Santas, Jordi Cuñé, Magda Rafecas

En proceso de revisión

Resumen

En el presente estudio se comparó *in vivo* la capacidad *fat-binding* selectiva de dos polímeros de quitosano con diferente viscosidad. Para ello, se utilizaron cobayas (n=8 animales por grupo) las cuales fueron alimentadas con dietas hipercolesterolémicas (17 g/100 g de grasa, 0,2 g/100 g de colesterol) que contenían 12 g/100 g de celulosa, quitosano de baja viscosidad (LV) o alta viscosidad (HV). Se controló el peso de los animales y el consumo de pienso, y se analizó el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos (AG) en heces, plasma e hígado. HV disminuyó en mayor medida que LV el consumo de pienso, el peso del animal y la absorción aparente de ácidos grasos. Sin embargo, los dos polímeros mostraron una capacidad anti-hipercolesterolémica y *fat-binding* selectiva similar. Entre los ácidos grasos saturados (AGS), los quitosanos presentaron una mayor afinidad de incrementar la excreción de ácido láurico (C12:0) y mirístico (C14:0) en comparación a AGS con mayores longitudes de cadena. La excreción de ácidos grasos insaturados (AGI) también fue incrementada en gran medida por los quitosanos. El ratio AGS/AGI en heces fue 9 veces inferior en los grupos alimentados con quitosano que en el grupo control, mientras que la relación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-6/n-3 fue aproximadamente dos veces superior. Pese a esto, el ratio AGS/AGI en el plasma y los hígados de los animales alimentados con quitosano no se vio alterado. Por el contrario, los dos polímeros redujeron el ratio n-6/n-3 del plasma, aunque en el hígado solo fue alterado por HV. En conclusión, el quitosano puede alterar la composición de AG del plasma y el hígado, pero solamente parece repercutir de manera relevante sobre la relación de AGPI n-6 y n-3.

Comparison of the hypolipidemic activity of high and low viscosity chitosans in guinea pigs: Effect on plasma and liver lipid content and fatty acid profile.

Jonathan Santas^{a,b}, Jordi Cuñé^b, Magda Rafecas^{a*}

^a Department of Nutrition and Food Science, XaRTA-INSA, University of Barcelona, 08028, Barcelona, Spain

^b AB-Biotics, S.A., Parc Tecnològic del Vallès, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

* Corresponding author: M.Rafecas

Tel: (+34) 934034841, Fax: (+34) 934035931.

E-mail: magdarafecas@ub.edu

Abbreviations

BA	Bile acid(s)
CA	Cholic acid
CDCA	Chenodeoxycholic acid
CE	Cellulose
FA	Fatty acid(s)
FAME	Fatty acid methyl ester(s)
HDL	High density lipoprotein
HV	High viscosity chitosan
LCA	Lithocholic acid
LDL	Low density lipoprotein
LV	Low viscosity chitosan
MUFA	Monounsaturated fatty acid(s)
NS	Neutral sterol(s)
PLP	Phospholipids
PUFA	Polyunsaturated fatty acid(s)
SEM	Standard error of the mean
SFA	Saturated fatty acid (s)
TAG	Triglycerides
TSFA	Total saturated fatty acids
TUFA	Total unsaturated fatty acids
UDCA	Ursodeoxycholic acid
UFA	Unsaturated fatty acid(s)

Abstract

In this study the selective *fat-binding* capacity of two chitosan polymers with different viscosity was compared *in vivo*. Guinea pigs (n=8 animals per group) were fed with high-fat hypercholesterolemic diets (17 g/100 g of fat, 0.2 g/100 g of cholesterol) containing 12 g/100 g of cellulose, low (LV) or high viscosity chitosan (HV). Subsequently, body weight and food consumption was monitored and the lipid content and fatty acid (FA) profile of faeces, plasma and liver were determined. HV caused a higher reduction than LV in food consumption, body weight gain and apparent absorption of FA. However, both polymers showed similar anti-hypercholesterolemic and selective fat-binding capacity. Among saturated fatty acids (SFA), chitosan had higher affinity to increase the excretion of lauric (C12:0) and myristic acids (C14:0) compared to SFA with longer chains. The excretion of unsaturated fatty acids (UFA) was also greatly increased by chitosan. The ratio of SFA to UFA in faeces was 9-fold lower in chitosan groups than in control, whereas that of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) was near 2-fold higher. However, the ratio of SFA to UFA of those animals fed chitosan was altered neither in plasma nor in liver. In contrast, the n-6/n-3 ratio in plasma was reduced by both polymers, but only by HV in liver. In conclusion, chitosan can alter the FA composition of plasma and liver, but changes are only relevant for the n-6 and n-3 PUFA balance.

Keywords: chitosan, fatty acids, cholesterol, bile acids, plasma, liver, cardiovascular diseases.

Introduction

Chitosan is a biopolymer obtained by the deacetylation of chitin which is found in the cell wall of certain fungi and is one of the major constituents of the exoskeleton of insects and crustaceans (Chiang et al., 2000). The basic structure of chitosan is based on units of D-glucosamine (deacetylated unit) and N-acetylated glucosamine (acetylated unit) randomly linked by β -(1 \rightarrow 4) glycosidic bonds (Aranaz et al., 2009). Owing to its unique structure, it presents high biological functions (Aam et al., 2010; Xia et al., 2011). For instance, chitosan has been shown to lower fat absorption (Deuchi et al., 1995a) and to exert

hypocholesterolemic activity both in animal (Liu et al., 2008; Zhang et al., 2008) and human studies (Choi et al., 2012; Liao et al., 2007).

Although the hypolipidemic mechanism of chitosan is still unclear, it has been mainly related to properties such as degree of deacetylation and molecular weight (Aranaz et al., 2009; Deuchi et al., 1995a; Ikeda et al., 1993). There is a general consensus supporting that chitosan polymers having higher degree of deacetylation are more efficient increasing fat excretion (Aranaz et al., 2009; Xia et al., 2011). It has been proposed that the free amino groups of chitosan can be positively charged in the intestine (Ylitalo et al., 2002). This would allow chitosan to bind fatty acids (FA) and other lipids by electrostatic forces and thus reduce their absorption (Deuchi et al., 1995a). In our previous research (Santas et al., 2012b), chitosan was shown to selectively increase FA excretion, thus altering the ratio of saturated fatty acids (SFA) to unsaturated fatty acids (UFA) and that of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in faeces. This effect, which can be also related to the unique cationic characteristics of chitosan, might be relevant as it is known that dietary FA have different repercussions on lipid metabolism and plasma cholesterol concentrations (Erkkila et al., 2008; Fernandez & West, 2005). In fact, it is generally recommended to lower the dietary intake of SFA and *trans* FA at the expense of an increased PUFA consumption (World Health Organization (WHO), 2003). In addition, there is an important concern on the dietary n-6 and n-3 PUFA balance (Deckelbaum & Calder, 2010). While some authors and organizations have advised to increase the consumption of n-6 PUFA to reduce coronary heart risk (Calder & Deckelbaum, 2011; Harris et al., 2009), others have proposed that high n-6 PUFA diets, typical of Western diets, may be associated with a large number of diseases, including cardiovascular and inflammatory disorders (Chilton et al., 2008; Simopoulos, 2002).

On the other hand, the role of molecular weight and viscosity of chitosan remains controversial as contradictory results have been reported (Deuchi et al., 1995a; Ikeda et al., 1993; Sugano et al., 1988). Therefore, the main aim of the present article was to study the hypolipidemic effect of two chitosan polymers differing in molecular weight and viscosity in animals fed hypercholesterolemic diets. In particular, the present study was

designed to compare the selective fat-binding capacity of both polymers and to determine whether it may affect the lipid content and FA profile of plasma and liver. We used the guinea pig as it is a more reliable model of human lipid metabolism than other more commonly used experimental animals, such as rats or hamsters (Fernandez & Volek, 2006).

2. Material and Methods

2.1. Materials

Ninety-nine percent or higher fatty acid methyl ester (FAME) standards, heneicosanoate acid (C21:0), oleic acid (C18:1n-9) and linolenic acid (C18:3n-3) were purchased from Larodan Fine Chemical AB (Malmö, Sweden). The rest of the FAME standards, bile acids, Sylon BTZ (3:2:3, BSA+TMCS+TMSI), Triton® X-100, anhydrous pyridine, cumene hydroperoxide (80%, CHP), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt and 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sterol standards were supplied by Steraloids (Newport, Rhode Island, USA). Diphenyl-1-pyrenylphosphine was purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, Michigan, USA).

Choroform, cyclohexane, methanol and diethyl ether were purchased from Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, Spain), while 1-butanol, anhydrous sodium sulphate and sodium chloride were bought from Panreac (Barcelona, Spain). *N*-hexane and boron trifluoride (20% in anhydrous methanol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium methylate 0.5 N was prepared by dissolving 17 g of sodium in 1 L of dry methanol. All solvents and reagents were analytical grade or higher and double deionised water was used throughout the study.

2.2. Diets

During the acclimation period animals were feed with 2040 Teklad Global Diet for Guinea Pig, Harlan Laboratories Inc (Madison, WI, USA). For the experimental period three diets designed to meet all the nutritional requirements of the guinea pigs were prepared by

Harlan Mucerola srl (Settimo Milanese, Italy). Detailed composition of experimental diets can be found in **Table 1**. The final composition of the diets was similar, except for the fiber source. The fibre used in the control group was cellulose (Harlan Laboratories Inc, Madison, WI, USA). The fibre sources of the experimental diets were low viscosity chitosan (Chitopharm® S, LV) and high viscosity chitosan (Chitopharm® L, HV) commercially available from Cognis Iberia (Barcelona, Spain). The deacetylation degree as determined by first derivative spectroscopy (Wu & Zivanovic, 2008) using a Shimadzu UV-3600 spectrophotometer (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany) was 70% for both polymers.

2.3. Animals

Dunkin Hartley female guinea pigs were supplied by Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain). Animals weighing 300-400 g were randomly assigned to the treatment groups (8 animals per group) after 1 week of acclimation. Guinea pigs were individually kept in stainless steel cage, which were wire-bottomed to avoid coprophagia. Animals were housed in a room with a controlled light cycle (light from 08:00 to 20:00 h) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ for 4 weeks of treatment. Food and water were consumed *ad libitum*. Periodically, the animals were weighed and food consumption was monitored. Faeces corresponding to periods of 48h were collected once a week, manually cleaned of sawdust contamination, weighed, homogenized, freeze-dried and stored at -20°C . At the beginning of the experimental period (time 0) animals were anesthetized with isoflurane and blood samples were obtained from the saphenous vein. After 28 days (four weeks) fasted guinea pigs were killed by heart puncture after isoflurane anesthesia. Blood samples were collected in heparinized tubes and plasma was separated after centrifugation at 1500g during 15 min at 4°C and stored at -80°C . Livers were extracted after the sacrifice, weighed, homogenized and stored at -80°C . All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

2.4. Viscosity, molecular weight and rheological determinations of chitosan samples.

The relative viscosity (η_{rel}) of chitosan solutions was determined by measuring the efflux time of chitosan solutions at 25°C using an Ostwald glass viscometer (Vidrafoc SA, Barcelona, Spain). An initial homogeneous polymer solution was prepared by weighting 200 mg of chitosan that was cautiously sprinkled into 200 mL of 0.25 M CH₃COOH/0.25 M CH₃COONa at 30°C with vigorous magnetic stirring (1000 rpm). After 30 min of incubation, the preparation was sonicated for 10 minutes and finally allowed to stand at room temperature for 4 h. Five different concentrations of chitosan were obtained by serial 2-fold dilutions. The η_{rel} was used to calculate specific (η_{sp}) and reduced viscosities (η_{red}) of the solution. The intrinsic viscosity $[\eta]$ was calculated from a Huggin's plot of the reduced viscosity versus concentration (Huggins, 1942). Viscosity average molecular weight (M_v) was estimated from the intrinsic viscosity by using Mark-Houwink-Sakurada's equation:

$$[\eta] = KM_v^a$$

The values used for K and a constants were $1.40 \cdot 10^{-4}$ and 0.83 respectively, corresponding to previously reported values for chitosan assayed under the same experimental conditions (Knaut et al., 1998a).

Rheological measurements were carried out by preparing 1% chitosan solutions in 0.1M CH₃COOH as described above and using a First RM rheometer (Lamy Rheometers, Champagne au Mont d'Or, France). The viscoelastic properties of chitosan solutions were determined at 25°C at share rates ranging from 5 to 250 s⁻¹.

2.5. Determination of lipids in faeces and diets.

Fatty acids (FA) and neutral sterols (NS) of faeces and diets, and bile acids (BA) of faeces were determined by gas chromatography as previously described (Santas et al., 2012b).

2.6. Plasma determinations

Plasma FA were determined as follows: six hundred microlitres of plasma corresponding to the end of the experimental period were added to a tube containing 50 µg of internal standard (C21:0). The extraction was performed with 20 mL of chloroform:methanol (2:1,

v/v) for 45 min with continuous magnetic stirring. The extract was filtered through a Whatman No. 1 and the residue re-extracted twice with 10 mL of the same solvent for 1 min. Then, 10 mL of NaCl 1% (w/v) was added, tubes shaken and centrifuged at 540g for 20 min. Chloroform phase was filtered through anhydrous sodium sulphate (Whatman No. 1 filter paper) which was subsequently washed with 5 mL of chloroform: methanol (2:1, v/v) and twice with 5 mL of chloroform. Solvent was evaporated in a vacuum rotatory evaporator at 30°C and allowed to dry at vacuum desiccator for 2 h. Lipids were re-extracted from flasks five times with diethyl ether which was finally removed from tubes with slight nitrogen stream at 30°C. Tubes were allowed to dry overnight in a vacuum desiccator. FAME were obtained as follows: 1 mL of sodium methylate 0.5 N was added to the tubes which were incubated in a boiling bath for 20 minutes. After cooling in a water bath, 1 mL of boron trifluoride (20% in anhydrous methanol) was added and incubated again in the same condition for 15 minutes. Tubes were cooled to ambient temperature and 2 mL of *n*-hexane was added. The tubes were shaken and 1 mL of NaCl saturated solution added and then shaken again. The clear *n*-hexane top layer was transferred to another tube and dried during 2 hours with sodium sulfate anhydrous. One mL of the extract was transferred to another tube, solvent evaporated to dryness under nitrogen flux at 30°C and finally re-suspended in 250 µL of *n*-hexane. Contents were transferred to injection vials and stored at -20°C until injection.

Plasma glucose was determined by glucose oxidase assay with an Ascensia Breeze® 2 glucometer from Bayer Healthcare (Sant Joan Despí, Spain). Plasma triglycerides (TAG) were determined by the glycerol phosphate oxidase assay kit from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and phospholipids (PLP) by using the EnzyChrom™ Phospholipid Assay Kit from Bioassay Systems (Hayward, CA, USA). LDL- and HDL-cholesterol were measured by commercially available kits from Química Clínica Aplicada S.A. (Amposta, Spain).

Plasma hydroperoxides were determined by using a diphenyl-1-pyrenylphosphine fluorescent probe (DPPP) as previously described (Santas et al., 2013), which allows the determination of total (lipid and protein) true hydroperoxides in plasma samples.

2.7. Determination of liver lipids

Liver FA were determined as follows: liver homogenates (1.5 g) were weighted in tubes containing 1.5 mg of C21:0 as internal standard. The extraction was performed with 20 mL of chloroform:methanol (2:1) using a Polytron PT3000 homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland) at 19,000-20,000 rpm for 20 s. The extract was filtered through a Whatman No. 1 and the residue extracted twice with 10 mL of the same solvent. The extract was purified as earlier described for plasma extracts. FAME were obtained as described for plasma but using 2.5 mL of sodium methylate 0.5 N, 3 mL of boron trifluoride (20% in anhydrous methanol), 3 mL of *n*-hexane and 4 mL of sodium chloride saturated solution. The *n*-hexane upper layer containing the FAME was allowed to dry for 2 hours in tubes containing sodium sulfate anhydrous and transferred to injection vials and stored at -20°C until injection.

TAG, PLP and cholesterol were determined after lipid extraction as described above. One millilitre of 1% Triton® X-100 in methanol was added to an appropriate aliquot of the final purified extract and the solvent evaporated to dryness under nitrogen flux at 30°C. Finally, deionised water was added and tubes were warmed for 15 min at 37°C for complete dissolution. TAG were analyzed by using an enzymatic kit from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), PLP by the EnzyChrom™ Phospholipid Assay Kit from Bioassay Systems (Hayward, CA, USA), and esterified and free cholesterol by using a kit from Biovision Inc. (Milpitas, CA, USA).

2.6. GC conditions

The FAME were analyzed using an Agilent 4890D gas chromatograph (Santa Clara, CA, USA), equipped with a flame ionization detector (FID). They were separated in a fused-silica capillary column (60 m x 0.25 mm i.d., 0.2 µm) from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The split-splitless injector was used in split mode with a split ratio of 1:30 and the injection volume was 1 µL. The injector and detector temperatures were kept at 270°C and 300°C, respectively. Oven temperature was programmed as follows: an initial temperature of 140°C for 3 min, followed by an increase of 6°C/min to 160°C, an increase of 2°C/min to

230°C and then an increase of 6°C/min to 250°C and finally left to stand for 15 min at 250°C. Helium was used as a carrier gas and nitrogen was used as the makeup gas to increase the detector's sensibility.

NS and BA were analyzed using a Perkin Elmer Autosystem gas chromatograph (Waltham, MA, USA) equipped with a FID. The separation of NS and BA was done with a 5% polysilarylene – 95% polydimethylsiloxane capillary column (60 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA). One microliter of sample and a split ratio of 1:12.5 were used for the injection. The injector and detector temperatures were kept at 290 and 350°C respectively. The oven temperature was programmed with an initial temperature of 245°C for 30s, followed by an increase of 5°C/min until 290°C and finally left to stand at this temperature for 30 min.

Chromatographic peaks were identified by comparing the retention times with those of known standards and by co-chromatography. The quantification of FAME, NS and BA was performed by the internal standard addition method and using calibration curves with $R^2 > 0.99$.

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed by SPSS v.17 for Windows (SPSS Inc. Chigago, IL, USA). The data were initially checked for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Any significant differences among the three dietary treatments were determined by one-way ANOVA. Data were analyzed by Duncan's multirange test to determine the exact nature of the differences among groups. In order to compare the initial and final results in each treatment, the equality of variances was assessed by Leven's test and the differences determined by the Student's *t*-test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results are expressed as means \pm SEM.

3. Results

3.1. Viscosity measurements and molecular weight of chitosan samples

The intrinsic viscosity $[\eta]$ of chitosan polymers was confirmed to be significantly different, being 5.9 and 11.7 dL g⁻¹ for LV and HV, respectively. The viscosity average molecular weight (M_v) estimated from $[\eta]$ was $37.3 \cdot 10^4$ for LV and $85.2 \cdot 10^4$ for HV.

The shear rate dependence of viscosity of 1% chitosan solutions in 0.1M CH₃COOH is shown in **Figure 1**. The flow curve of LV corresponded to that of a Newtonian fluid with a constant average viscosity of 78 mPa·s. In contrast, the viscosity of HV was dependent on the shear rate and ranged from 1080 to 293 mPa·s for shear rates from 5 to 250·s⁻¹, respectively. Hence, HV solution showed pseudoplastic (*shear-thinning*) behaviour. The viscosity of both chitosan solutions was not time-dependent and showed neither thixotropic nor rheopectic behaviour.

3.2. Body weight gain and food consumption

The body weight of guinea pigs through the study is shown in **Figure 2**. The body weight of those animals fed with CH increased slower than in CE fed animals. The difference on body weight gain was more pronounced when animals were fed with HV rather than when they were fed with LV (**Table 2**). While HV animals presented a lower body weight than CE animals during all the study, the body weight of LV fed animals only differed from the CE group during the first half of the study.

The average food consumption was similar in animals fed with CE or LV, but lower in those fed with HV. However, regardless of food consumption, food efficiency in chitosan diets had the same trend as body weight gain. The lowest food efficiency was observed in animals fed with HV (4.6 ± 2.0 g BW gain 100 g⁻¹ of food consumed). Food efficiency was also lower in animals from LV group than in CE group, with values of 14.4 ± 1.9 and 21.5 ± 1.0 g BW gain 100 g⁻¹ of food consumed, respectively.

3.3. Fatty acid excretion

The total dry weight of faeces excreted at the end of the experimental period was significantly increased by chitosan consumption (**Table 2**). The highest dry weight

excretion was observed in animals fed with HV. The dry weight excreted by those animals fed with LV was lower than in HV group, but approximately 4-fold higher than in CE group. FA composition of faeces is shown in **Table 3**. Total FA concentration in faeces was increased by chitosan consumption, being highest in HV animals. Taking into account the faecal dry weight excreted, the daily total FA excretion at the end of the study was significantly different between the three groups with values of 0.46 ± 0.06 , 2.26 ± 0.19 and 3.12 ± 0.33 g of FA animal⁻¹ day⁻¹ for CE, LV and HV, respectively. This implies that the apparent absorption of total FA was lower in those animals fed with chitosan compared to CE group, with values of 89.51 ± 1.49 , 52.79 ± 4.24 , 29.76 ± 4.78 % for CE, LV and HV respectively. Similar differences were observed already after one week of study.

The effect of chitosan on FA excretion was notably selective depending on the FA. Among SFA, the highest increment caused by chitosan consumption was observed in lauric (C12:0) and myristic acids (C14:0). The concentration of C12:0 in dry faeces was approximately 4- and 5-fold higher in LV and HV respectively compared to CE, whereas that of C14:0 was approximately 2-fold higher for both chitosan polymers (**Table 3**). But moreover, when the daily faecal excretion (in dry weight) is considered, the daily excretion of C12:0 was 14- and 22-fold higher in LV and HV respectively, than in CE fed animals, whereas that of C14:0 was approximately 7- and 10-fold higher in LV and HV groups, respectively. However, the affinity of chitosan to bind SFA with longer chain lengths and thus, increase their excretion was lower. In fact, the concentration of SFA such as palmitic (C16:0) and stearic acid (C18:0) in faeces was lower in animals fed with HV and LV compared to CE group (**Table 3**), although the total (daily) excretion of these FA resulted higher in animals fed with HV and LV than with CE due to their higher production of faeces. Hence, the excretion of C16:0 and C18:0 was 3-fold and 2-fold higher, respectively, in animals fed either LV or HV compared to CE. Thus, the overall excretion of TSFA was approximately 3-fold and 4-fold higher in LV and HV respectively than in CE fed animals.

Both chitosan polymers showed great efficiency in increasing the excretion of monounsaturated fatty acids (MUFA) as well as n-6 and n-3 PUFA. As a result, the total

concentration of UFA was 5-fold higher in faeces of animals fed with chitosan. Consequently, the total unsaturated fatty acid (TUFA) excretion was 20- and 30-fold higher in LV and HV groups respectively than in CE. Both chitosan polymers increased the excretion of linolenic acid (C18:2n-6) and α -linolenic acid (C18:3n-3), although HV was more efficient than LV. However, in both cases the increment for C18:2n-6 was higher than for C18:3n-3 resulting in a ratio of n-6/n-3 in faeces of both chitosan groups 2-fold higher than in CE. When the excretion of SFA was compared to that of TUFA, LV and HV were found to decrease the ratio of TSFA/TUFA compared to CE.

3.4. Sterol excretion

NS and BA excretion at the end of the procedure is shown in **Table 4**. Although the concentration of total NS in dry faeces was lower in the chitosan fed animals than in CE fed animals, total daily NS excretion in the chitosan groups (HV and LV) was approximately 2-fold higher than those fed with CE ($P < 0.01$), in agreement with the higher daily excretion of faeces in the chitosan groups (**Table 2**).

Results reveal that the NS composition of faeces was significantly altered by chitosan consumption. Coprostanol was the most abundant NS in faeces of CE group, whereas cholesterol was the most abundant NS in faeces of chitosan group. Cholesterol in chitosan groups was approximately 2-fold higher than in CE group. In contrast, the concentration of secondary metabolites of cholesterol (coprostanol, cholestanol and cholestanone) in faeces was lower after chitosan consumption. As a result the ratio of secondary metabolites of cholesterol to cholesterol in HV and LV faeces was significantly lower than in CE faeces. The concentration of β -sitosterol was similar in all the groups whereas that of sitostanol was also lower in both chitosan groups (compared with the CE control), However, due to the high total dry weight excreted daily by animals fed with chitosan, the total daily excretion of β -sitosterol resulted higher than in CE group. Between the chitosan polymers tested, no significant difference was observed on total NS excretion, although NS were more concentrated in LV faeces than in HV faeces.

Similar results were found for BA excretion. The highest BA excretion was observed in animals fed with LV, followed by HV animals and CE animals. Chitosan increased the total excretion of BA, although the increment in the excretion of chenodeoxycholic acid (CDCA) was higher than its respective metabolite lithocholic acid (LCA). This implies that the ratio LCA/CDCA was significantly lower in animals fed HV and LV than CE.

3.5. Plasma determinations

Treatment with hypercholesterolemic diets for 4 weeks was found to greatly increase fasting glucose, PLP and cholesterol levels, and decrease the HDL/LDL ratio in the control group (**Table 5**). A slight non-significant increment in the concentration of fasting plasma TAG was also observed. The consumption of either LV or HV was found to prevent the adverse effect of the diet hypercholesterolemic diets as, at the end of the experimental period, the levels of fasting glucose, PLP, LDL-cholesterol and HDL/LDL ratio remained similar to those at the beginning of the experiment.

The total FA concentration at the end of the procedure was near 4-fold lower in those animals fed with chitosan than in the CE group. The most abundant FA in all groups were C18:2n-6 (40-26 %), C18:1n-9 (24-14 %), C16:0 (24-18 %) and C18:0 (11-9 %). In general, chitosan reduced, independently of the viscosity, the concentration of all FA in plasma. The TSFA/TUFA ratio was not significantly altered by chitosan consumption. In contrast, the ratio of n-6/n-3 was approximately 2-fold lower in those animals fed with chitosan, mainly due to the higher reduction in the concentration of C18:2n-6.

Total plasma HP determined by means of a diphenyl-1-pyrenylphosphine fluorescent probe (DPPP) is shown in **Figure 3**. HV tended to increase plasma oxidation, although results were not statistically different ($P=0.056$).

3.6. Liver determinations

As shown in **Table 2** the liver weight of animals fed with chitosan was 33% lower than those fed with CE; however, no differences were observed between the two chitosan types. The concentrations of free and esterified cholesterol, but not triglycerides, were

reduced by both chitosan types (**Table 6**). PLP concentration tended to be slightly lower in those animals fed with chitosan, but differences between the three groups were not significant.

No significant differences were found in total FA concentration in liver (**Table 6**). However, since the liver weight of animals in chitosan groups was lower, the total amount of FA accumulated in the liver of those animals fed with LV and HV was also consequently lower, with values of 0.81 ± 0.07 , 1.06 ± 0.10 and 1.52 ± 0.11 mg of FA 100 per gram of weight of animal for HV, LV and CE, respectively ($P < 0.01$). As observed in plasma, the most abundant FA in all groups were C18:2n-6 (29-39 %), C18:1n-9 (13-14 %), C16:0 (16-18 %) and C18:0 (14-18 %). The FA profile in liver was significantly altered in HV group, but not by LV. Changes in the FA profile were only relevant for the n-6/n-3 ratio which decreased after consumption of HV. These changes were mainly due to the lower n-6 PUFA concentration, especially C18:2n-6, in animals fed HV compared to the other groups.

Discussion

Chitosan is a dietary fibre of considerable interest due to its beneficial biological activities and its potential medicinal applications (Aam et al., 2010). In the present study, food efficiency was reduced by both chitosan polymers, which is in good agreement with previous reports (Liu et al., 2008; Sugano et al., 1988). The high increment on fat excretion caused by chitosan, which implies lower lipid absorption, might be ascribed as the main mechanism responsible for this lower food efficiency. Moreover, an increment of lipid excretion and, mainly NS and BA excretion, can be related to the anti-hypercholesterolemic effect of chitosan, which prevented the high increment of plasma cholesterol caused by the diet. Lipid accumulation in the liver was also prevented as denoted by the lower liver weight and cholesterol concentration of animals fed with chitosan. These results are consistent with other studies (Ikeda et al., 1993; Zhang et al., 2008) and confirm those of Chiang et al. (2000) who reported that chitosan has a great effect on cholesteryl ester content when administered with hypercholesterolemic diets. Chitosan is also known for its antimicrobial properties (Aranaz et al., 2009), which may

lower the microbial activity in the intestine. As a result, the intestinal bioconversion of cholesterol and primary bile acids to their respective secondary metabolites was reduced as denoted by the lower ratios of secondary metabolites of cholesterol/ cholesterol and LCA/CDCA. These observations are in good agreement with previous reports (Fukada et al., 1991; Santas et al., 2012b) and shown that this effect is present regardless of the viscosity of the CH polymer.

The degree of deacetylation and the molecular weight of chitosan are known to be two important physicochemical properties that can affect its biological effects (Aranaz et al., 2009; Xia et al., 2011). There is a general consensus supporting that chitosan with higher deacetylation degrees are more efficient in reducing fat absorption (Deuchi et al., 1995a; Liu et al., 2008). This is likely due to the unique cationic characteristics of chitosan conferred by its free amino groups, which could lead to a higher lipid excretion by an adsorption mechanism. Likewise, it may also cause a selective excretion of FA which seems to be related with the polarity of the FA as has been previously discussed in detail in our previous study (Santas et al., 2012b). This would explain the high excretion of UFA as well as the lower affinity of chitosan to increase the excretion of SFA with long chains. In the present study the deacetylation degree of chitosan polymers was 70% which was considerably lower than that used in our previous study (94%) (Santas et al., 2012b). Consequently, these results show that the selective fat-binding capacity of chitosan is already present in chitosan polymers with a deacetylation degree of at least 70%. This selective effect of chitosan highlights the importance of studying the fat-binding capacity of CH using diets with different fat compositions. For instance, in a previous study Deuchi et al. (1995a) reported that chitosan was more efficient reducing the apparent fat digestibility of corn oil compared to lard fat. The authors attributed this effect to the lower solubility and higher viscosity of lard fat. However, based on our observations, it is reasonable to consider that differences may be also attributed to the selective effect of chitosan on FA excretion. In fact, it is well known that long chain SFA such as C16:0 and C18:0, which are less susceptible to the effect of chitosan, are more abundant in lard fat (U.S. Department of Agriculture (USDA), 2011).

In the present study, we determined whether the selective effect of chitosan polymers with different viscosity could significantly alter the FA profile of plasma and liver. Contrary to what could be expected from changes in the FA profile of faeces, significant changes in the TSFA to TUFA were observed neither in plasma nor in liver. It is known that although diet can alter the FA composition of tissues, the relative concentration of the major FA classes (SFA and UFA) is strongly regulated over a large variation of dietary fat composition under normal circumstances (Abbott et al., 2012). This regulation is especially relevant in cell membranes as the composition of membrane bilayers is genetically regulated to maintain its optimal fluidity and metabolic function (Berdanier, 2007). Therefore, potential changes in relative concentration of TSFA and TUFA caused by the selective effect of chitosan on FA absorption may be endogenously compensated to maintain the appropriate proportion of FA. In contrast, it has been reported that the relative concentrations of essential FA, 18:2n-6 and 18:3n-3, as well as their respective long chain PUFA are more responsive to changes in diet (Abbott et al., 2012; Berdanier, 2007). This is in good agreement with our findings as changes in the balance of n-3 and n-6 PUFA in plasma were inversely correlated with changes in the ratio of n-6/n-3 in faeces of animals fed with chitosan. Therefore, the present findings reveal that chitosan may play an important role on PUFA balance. However, further studies are necessary to confirm its physiological relevance on the prevention of disorders associated with the consumption of diets with high n-6/n-3 ratio. Moreover, these results must be cautiously extended to diets with different FA composition as it remains questionable whether long-term consumption of chitosan would lead to essential FA deficiency, especially when administered with diets containing low amounts of these FA.

On the other hand, whether the hypolipidemic capacity of chitosan is affected by its molecular weight and viscosity is still controversial. For instance, several studies have reported that the hypocholesterolemic properties of chitosan are not influenced by viscosity (Ikeda et al., 1993; Sugano et al., 1988). The present study allowed us to compare the hypolipidemic activity of two chitosan polymers differing in molecular weight and viscosity. The anti-hypercholesterolemic effect of chitosan was independent of viscosity as

both polymers were able to avoid the increase of plasma and liver cholesterol to a similar extent. These results confirm that the hypocholesterolemic effect of chitosan is mainly attributed to an adsorption mechanism as previously suggested by others (Deuchi et al., 1995a). This hypothesis seems to be reinforced by the fact that the selective effect of CH on FA absorption was maintained regardless of the viscosity of the polymer. However, some differences were observed depending on the viscosity of chitosan. For instance, HV reduced food consumption that was partly responsible for the lower body weight gain of animals fed with HV. Other authors have reported similar observations (Deuchi et al., 1995a; Gallaher et al., 2000), which can be attributed to a satiation effect, mainly due to a delayed gastric emptying as proposed for other viscous fibers (Howarth et al., 2001; Slavin, 2005). In addition, higher viscosity resulted in a lower FA absorption and thus in a lower food efficiency which correlates well with other studies (Chiang et al., 2000; Deuchi et al., 1995a). The effect of HV on FA absorption may also explain its higher influence on liver FA profile compared to LV as the n-6/n-3 ratio was altered by HV but not by LV. Finally, although results are not enough conclusive, the plasma oxidation levels suggest a possible undesirable effect of CH consumption. Chiang et al (2000) reported that CH can increase the amount of lipid peroxides *in vivo*. In fact, the authors also reported that this effect was more relevant in animals fed high viscosity chitosan and suggested that it could be attributed to a lower absorption of liposoluble vitamins with antioxidant effect such as vitamin E. This hypothesis is supported by previous studies which have reported that CH can affect fat-soluble vitamin status, including that of vitamin E (Deuchi et al., 1995b; Yao et al., 2010). Therefore, the higher effect on fat and nutrient absorption might be ascribed as the main cause of the higher content of plasma hydroperoxides in animals fed with HV. These results highlight the importance of evaluating not only the beneficial effects of chitosan, but also its potential adverse effects, especially at high doses or continuous intake.

5. Conclusions

In conclusion, chitosan with higher viscosities can have a higher effect on food consumption and food efficiency. However, the anti-hypocholesterolemic effect of chitosan is not dependent on the viscosity of the polymer at the range tested. This fact points to adsorption as the main hypolipidemic mechanism of chitosan which can also imply a selective effect on FA absorption. This selective effect is not reflected in changes in the relative concentration SFA and UFA, but can lead to a reduction of the ratio of n-6/n-3, especially in plasma. Therefore, chitosan can be of relevant interest to balance this ratio, although further studies are necessary to elucidate its clinical implication.

Acknowledgements

This study was funded by the Programa de Fomento de la Investigación Técnica CIT-060000-007-6 and S.A. DAMM. J. Santas was granted a Torres Quevedo fellowship. The authors thank R. Pastor, C. Fita and D. Abou-Khalil for their support during sample analysis, and Dr. A. Tres for her technical comments on the manuscript.

Tables

Table 1: Nutrient composition of experimental diets

Table 2: Food consumption, weight gain and liver weight

Table 3: Fatty acid excretion

Table 4: Neutral sterol and bile acid excretion

Table 5: Plasma determinations

Table 6: Liver determinations

Figures

Figure 1: Rheological measurement of chitosan solutions.

Figure 2: Body weight during the study

Figure 3: Plasma oxidation level

References

- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. H. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs*, 8(5), 1482-1517.
- Abbott, S. K., Else, P. L., Atkins, T. A., & Hulbert, A. J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(5), 1309-1317.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., & Heras, Á (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.
- Berdanier, C. (2007). Fatty Acids and Membrane Function. In C. K. Chow, *Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Third Edition* (pp. 693-712). CRC Press.
- Calder, P. C., & Deckelbaum, R. J. (2011). Harmful, harmless or helpful? the n-6 fatty acid debate goes on. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(2), 113-114.
- Chiang, M. -, Yao, H. -, & Chen, H. -. (2000). Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(5), 965-971.
- Chilton, F. H., Rudel, L. L., Parks, S. P., Arm, J. P., & Seeds, M. C. (2008). Mechanisms by which botanical lipids affect inflammatory disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 498S.
- Choi, C. -, Kim, E. -, Kim, Y. -, Je, J. -, An, S. -, Lee, J. D., Wang, J. H., Ki, S. S., Jeon, B. -, Moon, S. -, & Park, P. -. (2012). Chitooligosaccharides decreases plasma lipid levels in healthy men. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(1), 103-106.
- Deckelbaum, R. J., & Calder, P. C. (2010). Editorial: Dietary n-3 and n-6 fatty acids: Are there 'bad' polyunsaturated fatty acids? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13(2), 123-124.
- Deuchi, K., Kanauchi, O., Imasato, Y., & Kobayashi, E. (1995a). Effect of the viscosity or deacetylation degree of chitosan on fecal fat excreted from rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(5), 781-785.

- Deuchi, K., Kanauchi, O., Shizukuishi, M., & Kobayashi, E. (1995b). Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(7), 1211-1216.
- Erkkila, A., de Mello, V. D. F., Riserus, U., & Laaksonen, D. E. (2008). Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Progress in lipid research*, 47(3), 172-187.
- Fernandez, M. L., & West, K. L. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *The Journal of Nutrition*, 135(9), 2075.
- Fernandez, M. L., & Volek, J. S. (2006). Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutrition & Metabolism*, 3(17).
- Fukada, Y., Kimura, K., & Ayaki, Y. (1991). Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipids*, 26(5), 395-399.
- Gallaher, C. M., Munion, J., Hesslink, R., Wise, J., & Gallaher, D. D. (2000). Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2753.
- Harris, W. S., Mozaffarian, D., Rimm, E., Kris-Etherton, P., Rudel, L. L., Appel, L. J., Engler, M. M., Engler, M. B., & Sacks, F. (2009). Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: A science advisory from the American Heart Association nutrition subcommittee of the council on nutrition, physical activity, and metabolism; council on cardiovascular nursing; and council on epidemiology and prevention. *Circulation*, 119(6), 902-907.
- Howarth, N. C., Saltzman, E., & Roberts, S. B. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutrition reviews*, 59(5), 129-139.
- Huggins, M. L. (1942). The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. *Journal of the American Chemical Society*, 64(11), 2716-2718.

- Ikeda, I., Sugano, M., Yoshida, K., Sasaki, E., Iwamoto, Y., & Hatano, K. (1993). Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3), 431.
- Knaul, J. Z., Bui, V. T., Creber, K. A. M., & Kasaai, M. R. (1998). Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*, 76(11), 1699-1706.
- Liao, F. -, Shieh, M. -, Chang, N. -, & Chien, Y. -. (2007). Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. *Nutrition Research*, 27(3), 146-151.
- Liu, J., Zhang, J., & Xia, W. (2008). Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 107(1), 419.
- Santas, J., Guardiola, F., Rafecas, M., & Bou, R. (2013). Determination of total plasma hydroperoxides using a diphenyl-1- pyrenylphosphine fluorescent probe. *Analytical Biochemistry*, 434(1), 172-177.
- Santas, J., Espadaler, J., Mancebo, R., & Rafecas, M. (2012). Selective in vivo effect of chitosan on fatty acid, neutral sterol and bile acid excretion: A longitudinal study. *Food Chemistry*, 134(2), 940-947.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 56(8), 365.
- Slavin, J. L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition*, 21(3), 411-418.
- Sugano, M., Watanabe, S., Kishi, A., Izume, M., & Ohtakara, A. (1988). Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids*, 23(3), 187-191.
- U.S. Department of Agriculture (USDA) (2011). National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page.
- World Health Organization (WHO) (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases (WHO technical report series; 916)*. : WHO Technical Report Series.

- Wu, T., & Zivanovic, S. (2008). Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 248-253.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170-179.
- Yao, H. -, Lii, C. -, Chou, R. -, Lin, J. -, Yang, H. -, & Chiang, M. -. (2010). Effect of chitosan on hepatic drug-metabolizing enzymes and oxidative stress in rats fed low- and high-fat diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5187-5193.
- Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P., & Lehtimäki, T. (2002). Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 52(1), 1-7.
- Zhang, J., Liu, J., Li, L., & Xia, W. (2008). Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutrition Research*, 28(6), 383-390.

Table 1: Nutrient composition of experimental diets

	CE		LV		HV	
	<i>g/100g</i>	<i>Energy (%)</i>	<i>g/100g</i>	<i>Energy (%)</i>	<i>g/100g</i>	<i>Energy (%)</i>
Protein	18.8	18.3	18.8	18.3	18.8	18.4
Fat Mix ¹	17.1	37.5	17.2	37.5	16.8	36.8
Sugars ²	45.6	44.2	45.5	44.2	45.9	44.8
Mineral Mix ³	5.5		5.5		5.5	
Vitamin mix	1.0		1.0		1.0	
Cellulose	12					
Chitopharm S			12			
Chitopharm L					12	
<i>Fatty acids (mg g⁻¹)</i>						
C12:0	30.22 ± 0.42		30.06 ± 0.11		29.14 ± 0.10	
C14:0	9.66 ± 0.09		9.60 ± 0.02		9.37 ± 0.05	
C15:0	tr		tr		tr	
C16:0	16.78 ± 0.27		16.48 ± 0.04		16.26 ± 0.16	
C17:0	tr		tr		tr	
C18:0	13.88 ± 0.07		13.79 ± 0.06		13.58 ± 0.08	
C20:0	0.48 ± 0.00		0.48 ± 0.00		0.46 ± 0.00	
C22:0	0.29 ± 0.00		0.29 ± 0.00		0.28 ± 0.00	
C24:0	0.15 ± 0.01		0.16 ± 0.00		0.15 ± 0.00	
TSFA	71.46 ± 0.79		70.85 ± 0.14		69.26 ± 0.38	
C16:1n-7	0.69 ± 0.02		0.67 ± 0.00		0.66 ± 0.00	
C16:1n-9	tr		tr		tr	
C18:1n-7	1.51 ± 0.02		1.50 ± 0.01		1.47 ± 0.01	
C18:1n-9	29.21 ± 0.47		28.88 ± 0.11		28.30 ± 0.25	
C20:1n-9	0.29 ± 0.01		0.29 ± 0.00		0.29 ± 0.00	
MUFA	31.70 ± 0.52		31.34 ± 0.12		30.70 ± 0.26	
C18:2n-6	47.41 ± 0.43		47.39 ± 0.12		46.45 ± 0.33	
C18:3n-3	0.82 ± 0.03		0.78 ± 0.00		0.78 ± 0.01	
PUFA	48.23 ± 0.46		48.17 ± 0.12		47.23 ± 0.34	
TUFA	79.94 ± 0.96		79.51 ± 0.24		77.93 ± 0.60	
Total FA	151.40 ± 1.75		150.36 ± 0.30		147.19 ± 0.98	
Ratio of TUFA/TSFA	1.12 ± 0.00		1.12 ± 0.00		1.13 ± 0.00	
Ratio of n-6/n-3	57.68 ± 1.97		61.07 ± 0.22		59.50 ± 0.44	
<i>Neutral sterols (mg g⁻¹)</i>						
Cholesterol	1.95 ± 0.04		2.07 ± 0.02		1.93 ± 0.06	
Campesterol	0.09 ± 0.00		0.08 ± 0.01		0.09 ± 0.00	
β-sitosterol	0.22 ± 0.01		0.22 ± 0.00		0.22 ± 0.01	
Sitostanol	0.06 ± 0.00		0.06 ± 0.00		0.06 ± 0.00	
Total NS	2.32 ± 0.03		2.44 ± 0.03		2.29 ± 0.07	

¹ Fat mix contains olive oil/palm kernel oil/safflower oil (1:2:1.8, w/w/w)

² Added as cornstarch/sucrose (1:1.43, w/w)

³ Mineral and vitamin mix were adjusted to meet National Research Council requirements for guinea pigs. Mineral mix composition (g/100g): calcium phosphate 39.3, potassium acetate 29.6, calcium carbonate 9.1, magnesium oxide 9.1, potassium chloride 7.3, sodium chloride 3.6, ferric citrate 1.1, manganese sulfate, monohydrate 0.5, zinc carbonate 0.201, cupric sulfate 0.055, potassium iodate 0.002, chromium potassium sulfate, dodecahydrate 0.018, sodium selenite, pentahydrate 0.002, ammonium paramolybdate, tetrahydrate 0.002. Vitamin mix composition (g/100g): p-aminobenzoic acid 1.10, vitamin C (ascorbic acid) 10.17, biotin 0.004, vitamin B₁₂ (0.1% in mannitol) 0.30, calcium pantothenate 0.66, choline dihydrogen citrate 34.97, folic acid 0.02, inositol 1.10, vitamin K₃, menadione 0.50, pyridoxine HCl 0.99, niacin 0.22, riboflavin 0.22, thiamin HCl 0.22, vitamin A palmitate (500,000 IU/g) 0.40, vitamin D₃, cholecalciferol (500,000 IU/g) 0.04, vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g) 2.42, corn starch 46.67.

⁴Fatty acid and neutral sterol concentrations are expressed as means \pm SEM (n=4).

Abbreviations: CE, Cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm® S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm® L); TSFA, total saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids; FA, Fatty acids; NS; neutral sterols; tr, traces.

Table 2: Food consumption, weight gain and liver weight.

	CE	LV	HV
Initial body weight (g)	401.4 ± 7.5	406.8 ± 5.3	401.0 ± 5.3
Final body weight (g)	557.7 ± 11.3 ^b	510.2 ± 19.7 ^b	430.9 ± 16.2 ^a
Body weight (BW) gain (g)	156.3 ± 9.4 ^c	103.4 ± 16.0 ^b	30.6 ± 15.0 ^a
Food consumption (g animal ⁻¹ day ⁻¹)	26.9 ± 0.8 ^b	25.8 ± 1.1 ^b	21.6 ± 1.2 ^a
Food efficiency (g BW gain 100 g ⁻¹ consumed)	21.5 ± 1.0 ^c	14.4 ± 1.9 ^b	4.6 ± 2.0 ^a
Final faecal dry weight (g faeces animal ⁻¹ day ⁻¹)	2.2 ± 0.3 ^a	8.1 ± 0.6 ^b	9.5 ± 0.8 ^c
Liver weight (g liver 100 g ⁻¹ animal)	4.6 ± 0.2 ^b	3.1 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.1 ^a

Results are expressed as means ± SEM (n= 8). Results in the same row not sharing a common superscript are significantly different based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05.

Abbreviations: CE, cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm® S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm® L).

Table 3: Fatty acid excretion

	CE		LV		HV	
C12:0	7.91 ±	0.89 ^a	30.04 ±	1.97 ^b	41.05 ±	2.55 ^c
C14:0	9.95 ±	0.59 ^a	19.34 ±	0.71 ^b	21.97 ±	0.87 ^c
C15:0	0.38 ±	0.04 ^b	0.14 ±	0.01 ^a	0.17 ±	0.02 ^a
C16:0	57.71 ±	3.18 ^b	48.48 ±	0.92 ^a	46.67 ±	1.05 ^a
C17:0	0.31 ±	0.02 ^b	0.19 ±	0.00 ^a	0.20 ±	0.01 ^a
C18:0	108.40 ±	7.80 ^b	44.88 ±	1.13 ^a	47.34 ±	3.44 ^a
C20:0	2.82 ±	0.13 ^b	1.54 ±	0.04 ^a	1.38 ±	0.02 ^a
C22:0	1.70 ±	0.08 ^b	1.05 ±	0.10 ^a	0.88 ±	0.01 ^a
C24:0	1.16 ±	0.07 ^b	0.59 ±	0.02 ^a	0.58 ±	0.02 ^a
TSFA	190.35 ±	9.68 ^b	146.25 ±	3.43 ^a	160.23 ±	6.54 ^a
C16:1n-7	0.16 ±	0.02 ^a	1.11 ±	0.07 ^b	1.43 ±	0.09 ^c
C18:1n-7	1.11 ±	0.17 ^a	3.51 ±	0.15 ^b	3.98 ±	0.16 ^b
C18:1n-9	10.18 ±	1.17 ^a	53.35 ±	2.92 ^b	65.10 ±	3.76 ^c
C20:1n-9	0.39 ±	0.04 ^a	0.68 ±	0.02 ^b	0.69 ±	0.00 ^b
MUFA	11.84 ±	1.39 ^a	58.66 ±	3.16 ^b	71.20 ±	4.00 ^c
C18:2n-6	10.65 ±	1.50 ^a	71.83 ±	4.70 ^b	92.07 ±	7.02 ^c
C18:3n-3	0.26 ±	0.02 ^a	0.92 ±	0.05 ^b	1.27 ±	0.07 ^c
PUFA	10.91 ±	1.52 ^a	72.75 ±	4.75 ^b	93.34 ±	7.08 ^c
TUFA	22.75 ±	2.91 ^a	131.40 ±	7.79 ^b	164.54 ±	10.97 ^c
Total FA	213.10 ±	10.72 ^a	277.66 ±	10.68 ^b	324.77 ±	16.11 ^c
Ratio of TSFA/TUFA	9.02 ±	1.01 ^b	1.14 ±	0.07 ^a	0.99 ±	0.05 ^a
Ratio of n-6/n-3	40.45 ±	3.01 ^a	77.95 ±	1.10 ^b	72.08 ±	2.87 ^b

Results are expressed as means ± SEM in µg of FA mg⁻¹ of dry faeces (n= 8). Results in the same row not sharing a common superscript are significantly different based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05.

Abbreviations: CE, cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm® S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm® L); DW, dry weight, TSFA, total saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids; FA, Fatty acids.

Table 4: Neutral sterol and bile acid excretion

	CE		LV		HV	
	$\mu\text{g mg}^{-1}$	mg day^{-1}	$\mu\text{g mg}^{-1}$	mg day^{-1}	$\mu\text{g mg}^{-1}$	mg day^{-1}
<i>Neutral sterols</i>						
Cholesterol	3.09 ± 0.44^a	6.52 ± 1.04^x	7.84 ± 0.13^c	63.32 ± 4.59^y	6.89 ± 0.17^b	65.73 ± 5.93^y
Coprostanol	9.25 ± 0.54^b	20.37 ± 3.20^y	0.19 ± 0.19^a	1.28 ± 1.28^x	0.15 ± 0.15^a	1.75 ± 1.75^x
Cholestanol	0.97 ± 0.04^b	2.18 ± 0.35^y	tr ^a	tr ^x	tr ^a	tr ^x
Cholestanone	0.79 ± 0.04^b	1.76 ± 0.26^x	0.51 ± 0.06^a	3.97 ± 0.36^y	0.42 ± 0.11^a	4.03 ± 0.94^y
Campesterol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β -sitosterol	0.73 ± 0.13	1.60 ± 0.35^x	0.94 ± 0.04	7.55 ± 0.59^y	0.77 ± 0.05	7.26 ± 0.54^y
Sitostanol	0.30 ± 0.06^b	0.71 ± 0.17^y	nd ^a	nd ^{0.00^x}	tr ^a	tr ^x
Total NS	15.13 ± 0.43^c	33.15 ± 4.39^x	9.48 ± 0.29^b	76.11 ± 4.93^y	7.21 ± 1.04^a	68.93 ± 11.75^y
Secd./Chol. ^y	4.10 ± 0.66^b		0.09 ± 0.03^a	0.03	0.08 ± 0.03^a	
<i>Bile acids</i>						
CA	tr	tr	tr	tr	tr	tr
CDCA	0.14 ± 0.01^a	0.32 ± 0.05^x	1.46 ± 0.14^c	11.85 ± 1.52^y	1.07 ± 0.16^b	10.53 ± 2.08^y
DCA	0.01 ± 0.00^a	0.03 ± 0.01^x	0.19 ± 0.04^b	1.46 ± 0.30^y	0.12 ± 0.02^y	1.25 ± 0.24^y
LCA	1.64 ± 0.14^{ab}	3.53 ± 0.54^x	2.34 ± 0.29^b	18.52 ± 2.05^z	1.13 ± 0.23^a	10.54 ± 2.25^y
UDCA	0.32 ± 0.04^b	0.70 ± 0.10^x	0.17 ± 0.02^a	1.30 ± 0.12^y	0.11 ± 0.03^a	0.99 ± 0.29^{xy}
Total BA	2.12 ± 0.15^a	4.59 ± 0.67^a	4.15 ± 0.32^b	33.13 ± 3.07^c	2.13 ± 0.38^a	23.31 ± 3.59^b
LCA/CDCA	11.80 ± 1.46^b		1.71 ± 0.26^a		1.27 ± 0.37^a	

Results are expressed in concentration ($\mu\text{g mg}^{-1}$ of dry faeces) or excretion ($\text{mg animal}^{-1} \text{ day}^{-1}$) as means \pm SEM (n=8). Concentrations (a, b, c) or excretions (x, y, z) in the same row that do not share a common superscript are significantly different based on Duncan's Multirange Test at $P < 0.05$.

Abbreviations: CE, cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm® S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm® L); NS, neutral sterols, BA, bile acids, CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; LCA, lithocholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid; Total BA, Total bile acids; nd, not detected; tr, traces.

^y Ratio of secondary metabolites of cholesterol to cholesterol.

Table 5: Plasma determinations

		CE	LV	HV
Glucose:	Basal	138.29 ± 6.12	151.50 ± 14.59	149.57 ± 12.46
	Final	358.57 ± 21.68 ^{b*}	149.00 ± 19.87 ^a	170.86 ± 26.38 ^a
TAG:	Basal	44.80 ± 4.00	47.00 ± 2.60	44.70 ± 2.9
	Final	52.10 ± 10.70	35.80 ± 5.20	49.10 ± 11.10
PLP:	Basal	41.62 ± 3.42	35.24 ± 2.92	40.94 ± 2.29
	Final	265.12 ± 15.51 ^{b*}	39.56 ± 3.98 ^a	45.88 ± 5.52 ^a
LDL-c:	Basal	14.80 ± 3.21	17.16 ± 4.15	18.82 ± 1.52
	Final	266.15 ± 40.94 ^{b*}	14.47 ± 3.21 ^a	30.30 ± 13.07 ^a
HDL-c:	Basal	38.67 ± 3.99	34.42 ± 1.90	42.65 ± 2.22
	Final	54.03 ± 5.52 ^{b*}	31.88 ± 0.77 ^a	26.21 ± 2.53 ^{a*}
HDL/LDL:	Basal	2.84 ± 0.65	2.95 ± 0.63	2.33 ± 0.27
	Final	0.24 ± 0.04 ^{a*}	2.95 ± 0.59 ^b	1.77 ± 0.89 ^b
<i><u>Final FA concentration</u></i>				
C12:0		10.98 ± 2.57 ^b	3.11 ± 1.24 ^a	3.53 ± 0.88 ^a
C14:0		34.68 ± 3.56 ^b	4.79 ± 0.68 ^a	5.98 ± 0.89 ^a
C15:0		1.98 ± 0.20 ^b	0.35 ± 0.05 ^a	0.45 ± 0.06 ^a
C16:0		93.36 ± 9.71 ^b	47.98 ± 17.66 ^a	48.46 ± 10.86 ^a
C17:0		1.04 ± 0.12 ^b	0.38 ± 0.07 ^a	0.54 ± 0.07 ^a
C18:0		57.24 ± 5.67 ^b	15.57 ± 2.89 ^a	18.54 ± 2.48 ^a
C20:0		0.76 ± 0.15	0.45 ± 0.20	0.36 ± 0.13
C22:0		0.78 ± 0.09 ^b	0.29 ± 0.07 ^a	0.25 ± 0.04 ^a
C24:0		1.09 ± 0.32 ^b	0.17 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.04 ^a
TSFA		201.90 ± 20.01 ^b	73.09 ± 22.56 ^a	78.26 ± 14.77 ^a
C16:1n-7		2.12 ± 0.24 ^b	0.70 ± 0.15 ^a	0.85 ± 0.20 ^{ab}
C16:1n-9		4.60 ± 0.49 ^b	2.49 ± 0.41 ^a	4.37 ± 0.97 ^a
C18:1n-7		5.93 ± 0.57 ^b	1.61 ± 0.48 ^a	1.88 ± 0.32 ^a
C18:1n-9		76.41 ± 8.20	47.00 ± 14.99	47.80 ± 8.99
C20:1n-9		0.96 ± 0.12 ^b	0.38 ± 0.09 ^a	0.40 ± 0.06 ^a
MUFA		90.02 ± 9.51 ^b	52.18 ± 15.81 ^a	55.30 ± 10.11 ^a
C18:3n-3		6.30 ± 0.92 ^b	3.63 ± 0.90 ^a	4.46 ± 0.71 ^{ab}
C20:5n-3		0.62 ± 0.09	0.37 ± 0.07	0.46 ± 0.10
C22:5n-3		1.20 ± 0.17 ^b	0.32 ± 0.05 ^a	0.66 ± 0.10 ^a
C22:6n-3		2.91 ± 0.46 ^b	0.76 ± 0.13 ^a	1.47 ± 0.28 ^a
Total n-3		11.02 ± 1.52 ^b	5.07 ± 1.12 ^a	7.06 ± 0.99 ^a
C18:2n-6		213.08 ± 20.46 ^b	56.71 ± 9.25 ^a	47.99 ± 4.35 ^a
C18:3n-6		0.75 ± 0.08 ^b	0.42 ± 0.04 ^a	0.50 ± 0.04 ^a
C20:2n-6		2.27 ± 0.22 ^b	0.52 ± 0.09 ^a	0.52 ± 0.06 ^a
C20:3n-6		0.85 ± 0.09 ^b	0.22 ± 0.03 ^a	0.28 ± 0.02 ^a

C20:4n-6	6.97 ± 0.69 ^b	1.83 ± 0.16 ^a	2.06 ± 0.11 ^a
C22:4n-6	0.80 ± 0.10 ^b	0.14 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.02 ^a
C22:5n-6	0.47 ± 0.10 ^b	0.09 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.02 ^a
Total n-6	225.20 ± 21.51 ^b	59.94 ± 9.42 ^a	51.69 ± 4.40 ^a
PUFA	236.22 ± 22.66 ^b	65.01 ± 10.43 ^a	51.41 ± 8.48 ^a
TUFA	326.24 ± 29.40 ^b	117.19 ± 25.99 ^a	114.05 ± 14.49 ^a
Total FA	528.14 ± 48.20 ^b	190.28 ± 48.46 ^a	192.32 ± 28.90 ^a
Ratio of TSFA/TUFA	0.62 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.66 ± 0.05
Ratio of n-6/n-3	21.70 ± 1.88 ^c	12.60 ± 1.18 ^b	7.99 ± 1.16 ^a

Results are expressed as means ± SEM in mg dL⁻¹ of plasma (n=8). Results in the same row not sharing a common superscript are significantly different based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05. Differences between initial and final values based on the Student's t-test are denoted as * for P<0.05.

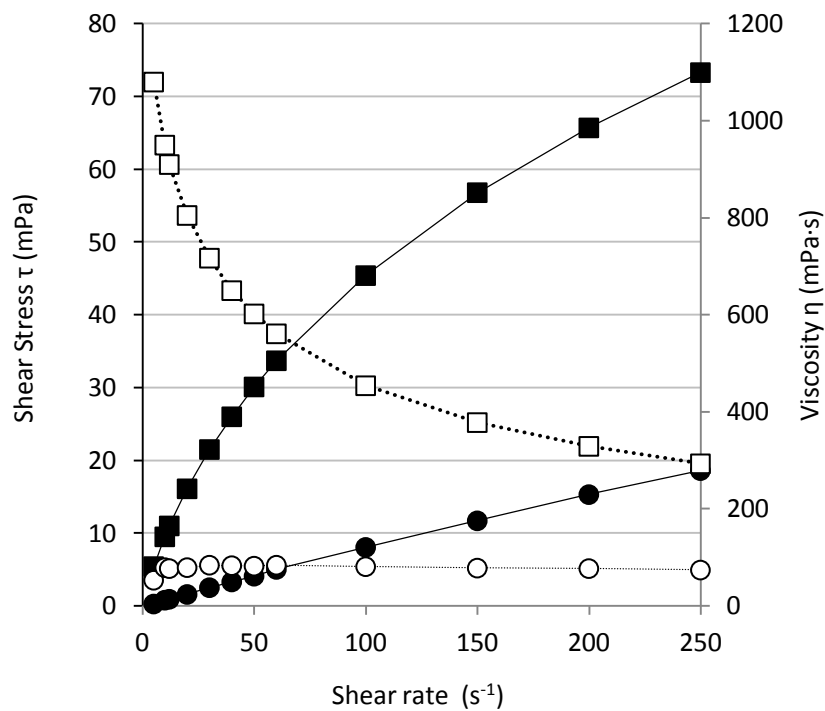
Abbreviations: CE, cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm® S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm® L); TAG, triglycerides; PLP; Phospholipids, LDL-c, low density lipoprotein cholesterol; HDL-c, high density lipoprotein cholesterol, TSFA, total saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids; FA, Fatty acid(s).

Table 6: Liver determinations

	CE	LV	HV
Triglycerides	15.68 ± 2.74	20.24 ± 3.83	13.46 ± 3.48
Phospholipids	11.20 ± 1.99	9.43 ± 1.60	8.66 ± 1.78
Free cholesterol	2.51 ± 0.15 ^b	1.83 ± 0.14 ^a	1.61 ± 0.07 ^a
Esterified cholesterol	2.68 ± 0.37 ^b	0.33 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.02 ^a
<i><u>FA concentration</u></i>			
C12:0	0.36 ± 0.06	0.59 ± 0.09	0.42 ± 0.07
C14:0	1.01 ± 0.13	1.34 ± 0.15	0.94 ± 0.12
C15:0	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01
C16:0	5.34 ± 0.42	6.13 ± 0.72	4.92 ± 0.42
C17:0	0.09 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
C18:0	5.31 ± 0.19	4.79 ± 0.19	4.81 ± 0.24
C20:0	0.03 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a
C22:0	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
C24:0	0.03 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^{ab}	0.01 ± 0.00 ^a
TSFA	12.27 ± 0.72	13.09 ± 1.06	11.33 ± 0.80
C16:1n-7	0.25 ± 0.03	0.60 ± 0.08	0.53 ± 0.07
C16:1n-9	0.08 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^b
C18:1n-7	0.40 ± 0.03 ^b	0.41 ± 0.05 ^b	0.28 ± 0.02 ^a
C18:1n-9	4.47 ± 0.51	4.98 ± 0.76	3.77 ± 0.33
C20:1n-9	0.05 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
MUFA	5.25 ± 0.58	6.15 ± 0.90	4.72 ± 0.40
C18:3n-3	0.67 ± 0.09	0.69 ± 0.21	0.83 ± 0.20
C20:5n-3	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02
C22:5n-3	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.03
C22:6n-3	0.46 ± 0.04	0.61 ± 0.11	0.77 ± 0.17
Total n-3	1.32 ± 0.14	1.51 ± 0.22	1.79 ± 0.32
C18:2n-6	12.83 ± 1.06 ^b	12.29 ± 1.23 ^b	7.95 ± 0.84 ^a
C18:3n-6	0.04 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^c	0.05 ± 0.01 ^b
C20:2n-6	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.02
C20:3n-6	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
C20:4n-6	0.93 ± 0.04	1.07 ± 0.05	1.06 ± 0.07
C22:4n-6	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
C22:5n-6	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01
Total n-6	14.24 ± 1.12 ^b	13.89 ± 1.28 ^b	9.49 ± 0.92 ^a
PUFA	15.56 ± 1.21 ^b	15.40 ± 1.34 ^b	11.28 ± 1.21 ^a
TUFA	20.81 ± 1.78	21.55 ± 2.21	16.00 ± 1.47
Total FA	33.08 ± 2.49	34.65 ± 3.26	27.32 ± 2.23
Ratio of TSFA/TUFA	0.61 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.69 ± 0.05
Ratio of n-6/n-3	11.21 ± 0.92 ^b	10.18 ± 1.65 ^b	5.82 ± 0.77 ^a

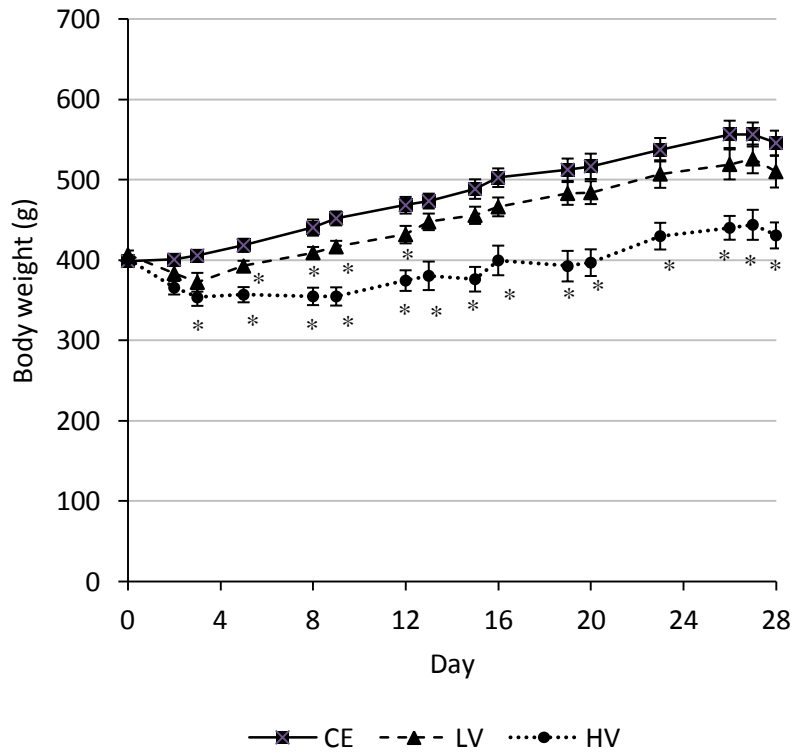
Results are expressed as means \pm SEM in mg g⁻¹ of liver (n=8). Results in the same row not sharing a common superscript are significantly different based on one-way ANOVA and Duncan's Multirange post-hoc test at P<0.05.

Abbreviations: CE, cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm® S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm® L); TSFA, total saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids; FA, Fatty acid(s).

Figure 1: Rheological measurement of chitosan solutions.

Values of shear stress (τ) at various shear rates are expressed in mPa for low viscosity chitosan (LV) (●) and high viscosity chitosan (HV) (□) in 0.1M CH_3COOH . Values of viscosity are expressed in mPa·s for low viscosity chitosan (LV) (○) and high viscosity chitosan (HV) (□) in 0.1M CH_3COOH .

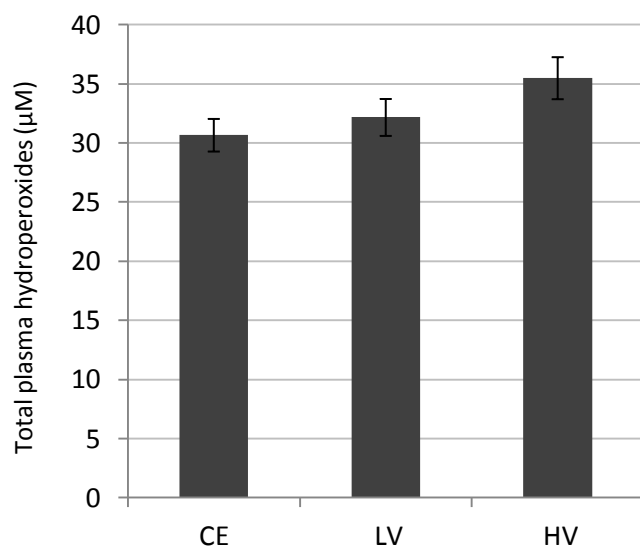
Figure 2: Body weight during the study



Data points represent means with SEM bars (n=8). An asterisk (*) indicates for each guinea pig age, body weight values that are significantly different from the CE control. (P<0.05).

Abbreviations: CE, cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm® S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm® L).

Figure 3: Plasma oxidation level



Results represent means with SEM bars in μmols of cumene hydroperoxide eq. (CHP) L^{-1} of plasma ($n=8$). No significant differences were found between groups ($P=0.056$).

Abbreviations: CE, cellulose; LV, low viscosity chitosan (Chitopharm[®] S); HV, high viscosity chitosan (Chitopharm[®] L).

4.5. DETERMINACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS TOTALES EN PLASMA MEDIANTE EL USO DEL FLUORÓFORO DIFENIL-1-PIRENILFOSFINA

Jonathan Santas, Francesc Guardiola, Magda Rafecas, Ricard Bou

Analytical Biochemistry, (1), 172-177 (2013)

El estrés oxidativo puede tener una importante repercusión sobre la incidencia de numerosas patologías tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, y numerosos procesos fisiológicos como el envejecimiento. Los hidroperóxidos plasmáticos son ampliamente reconocidos como un buen biomarcador del estrés oxidativo. En el presente artículo se propone un método fluorimétrico para la determinación de todo tipo de hidroperóxidos plasmáticos mediante el uso del fluoróforo difenil-1-pirenilfosfina (DPPP). Los límites de detección y de cuantificación del método fueron de 0,08 y 0,25 nmoles equivalentes de hidroperóxido de cumeno (CHP) en 40 μ L de plasma, respectivamente. El método tiene una buena precisión (5,3% para 14,5 μ M eq. de CHP, n=8) y una recuperación del 91% y 92% después de la adición de 26 y 52 μ M de patrón, respectivamente. La selectividad del método propuesto es superior al 96%. Además, la optimización de las condiciones de reacción y la adición de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 2,6-di-*tert*-butyl-4-metilfenol (BHT) previene la formación artificial de hidroperóxidos durante el análisis. En base a esto, el método propuesto resulta útil para la determinación de hidroperóxidos totales en muestras de plasma de manera simple y cuantitativa.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Determination of total plasma hydroperoxides using a diphenyl-1-pyrenylphosphine fluorescent probe

Jonathan Santos^{a,b}, Francesc Guardiola^a, Magda Rafecas^a, Ricard Bou^{a,c,*}^a Department of Nutrition and Food Science, XaRTA-INSA, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain^b AB-Biotics, 08290 Cerdanyola del Vallès, Spain^c Institute of Food Science Technology, and Nutrition (ICTAN),¹ CSIC, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2012

Received in revised form 22 November 2012

Accepted 27 November 2012

Available online 7 December 2012

Keywords:

Oxidative stress

Hydroperoxides

Plasma

Diphenyl-1-pyrenylphosphine

ABSTRACT

Plasma hydroperoxides (HPs) are widely accepted to be good indicators of oxidative stress. By means of the method proposed here, which uses diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) as a fluorescent probe, all types of plasma HP were determined. The limits of detection and quantification of the method were 0.08 and 0.25 nmol of cumene hydroperoxide (CHP) equivalents in 40 μ l of plasma, respectively. The method is satisfactory in terms of precision (5.2% for 14.5 μ M CHP eq., $n = 8$), and the recoveries were 91% and 92% after standard additions of 26 and 52 μ M CHP, respectively. The selectivity of the proposed method is higher than 96%. Moreover, optimization of the reaction conditions and the addition of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt and 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) prevented the formation of HP artifacts during the analysis. Therefore, the proposed method is useful for simple and quantitative determination of total plasma HPs.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Oxidative stress plays an important role in the development of many pathologies, including cancer [1,2] and cardiovascular [3,4] and neurodegenerative diseases as well as other physiological processes such as aging [5,6]. Among the different methods used for the assessment of oxidative stress, the determination of lipid oxidation products in plasma has been widely accepted as a good indicator of oxidative imbalance [7]. However, there is growing evidence that proteins are also a major target of reactive oxygen species, and the resulting oxidative damage can lead to loss of their biological function. Furthermore, some protein oxidation products are good biomarkers to predict neurological disorders and age-related diseases [6,8]. Therefore, due to the biological relevance of oxidative damage regardless of its lipid or protein origin, the overall measurement of oxidation products by means of accurate and simple methods is of interest.

Routine analysis techniques to estimate oxidative stress in biological samples include iodometric assays [9], spectrophotometric determination of conjugated dienes [7,10], determination of thiobarbituric acid reactive substances values [11], and measurement of carbonyl content [12]. However, these methods are usually criticized for their lack of sensitivity and/or specificity. More sensitive

methods, such as determination of hydroperoxides (HPs)² using luminol chemiluminescence [13] or HP activation of cyclooxygenase [14], have also been proposed. However, the application of these methods is sometimes limited because they are often complex and require sophisticated instrumentation [13]. Alternatively, plasma lipid and protein HPs can be determined by the formation of colored metal complexes with thiocyanate or xylenol orange. These methods are satisfactory in terms of sensitivity and simplicity [15,16], but the procedures are subject to interference caused by chelators, ferric iron, some redox compounds, or the presence of other chromophores. The ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) method is commonly used for all kinds of biological sample, but plasma samples contain many compounds that can react with the dye and thus interfere with determination. Hence, it is common to use specific reducing agents for HPs to discriminate the background signal from authentic HPs [16,17].

However, diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) is a nonfluorescent molecule that specifically reacts with HPs to form DPPP oxide, which then emits fluorescence at 380 nm (excitation wavelength = 353 nm). In fact, the use of DPPP has been proven to allow

* Corresponding author. Address: Department of Nutrition and Food Science, XaRTA-INSA, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 403 5931.

E-mail addresses: ricard_bou@ictan.csic.es, ricard_bou@ub.edu (R. Bou).

¹ Formerly Instituto del Frío CSIC.

² Abbreviations used: HP, hydroperoxide; FOX, ferrous oxidation-xylenol orange; DPPP, diphenyl-1-pyrenylphosphine; HPLC, high-performance liquid chromatography; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; BHT, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol; PBS, phosphate-buffered saline; GdnHCl, guanidine hydrochloride; CHP, cumene hydroperoxide; TPP, triphenylphosphine; URP, unoxidized rat plasma; ORP, oxidized rat plasma; LDL, low-density lipoprotein; RSD, relative standard deviation.

selective and very sensitive determination of lipid HPs in biological samples using flow injection and high-performance liquid chromatography (HPLC) postcolumn methods [18,19]. In addition, it has recently been reported that lipid and protein HPs can be determined by this fluorescent probe using simple batch methods [20].

The aim of this study was to set up and validate a modified version of this method based on the DPPP fluorescent probe for simple, sensitive, and selective determination of total lipid and protein HPs in plasma due to their clinical relevance as biomarkers of oxidative stress.

Materials and methods

Materials

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt solution, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), phosphate-buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4), guanidine hydrochloride (GdnHCl), 80% cumene hydroperoxide (CHP), and triphenylphosphine (TPP) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). DPPP was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Methanol and *n*-butanol were of HPLC grade and purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Bidistilled water was obtained using a Milli-Q Gradient System (Millipore, Billerica, MA, USA). Positive displacement pipettes were used throughout the study.

Final procedure for determination of total plasma HPs

The entire procedure was conducted under subdued light conditions, and 1.5-ml microtubes with a safe-lock were used to avoid evaporation. First, 40 μ l of plasma was mixed with 160 μ l of a solution that contained 0.125% EDTA and 6 M GdnHCl in PBS. Then, 100 μ l of 4 mM BHT in methanol was immediately added. After vortexing for 1 min, 100 μ l of 400 μ M DPPP and 4 mM BHT in butanol were added, and samples were vortexed again for 1 min. These solutions were prepared extemporaneously. The final concentrations of EDTA, BHT, and DPPP were 0.05%, 2 mM, and 100 μ M, respectively. The head-space of the microtubes was flushed with nitrogen and immediately closed, and then samples were incubated at 40 °C for 3 h under constant agitation. The reaction was stopped by placing the samples in an ice bath for 20 min. Then, 1 ml of 6 M GdnHCl in PBS was added and samples were vortexed for 1 min. After that, 100 μ l of the resulting solution was thoroughly mixed for 2 min with 1 ml of butanol, and samples were then centrifuged at 1500g for 10 min at 4 °C. Next, 100 μ l of the supernatant was immediately transferred to 96-microwell plates, and fluorescence was determined in a FLUOstar Optima fluorimeter (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 30 °C using the 360 \pm 10-nm and 380 \pm 10-nm fluorescence filters for excitation and emission, respectively. The signal was consecutively measured at intervals of 2 min for 10 min. Because the signal was observed to be stable, the average of the measurements was used for calculations.

Sample collection

Blood samples were extracted by heart puncture from healthy Sprague–Dawley rats (6–8 months old) fed with 2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet (Teklan Harlan, Madison, WI, USA). Samples were collected in heparin tubes as anticoagulant and immediately centrifuged at 1500g for 15 min at 4 °C for plasma separation. Plasma samples used for method development were pooled and stored in aliquots at –80 °C until analysis to avoid oxidation (unoxidized rat plasma, URP). Plasma samples used to determine the precision and recovery of the method were stored in the dark at 4 °C and analyzed within 24 h after extraction (fresh URP).

Hypercholesterolemic blood samples were obtained from eight Dunkin–Hartley guinea pigs (4 weeks old) from Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain). Animals were fed with 2040 Teklad Global Diet for guinea pigs (Teklan Harlan) for 1 week of acclimation. Subsequently, blood samples from fasting animals were obtained from the saphenous vein and collected in heparin tubes. Animals were switched to a hypercholesterolemic experimental diet, the composition of which was as follows: protein, 18.8%; fat, 17.1%; carbohydrates (nonfiber), 45.6%; cellulose, 12.0%; cholesterol, 0.25%; mineral mix, 5.5%; and vitamin mix, 1.0%. The fat mix content of the diet was olive oil/palm-kernel oil/safflower oil (1:2:1.8), and the carbohydrates were added as starch/sucrose (1:1.34). The mineral and vitamin mix was designed to meet all of the nutritional requirements of guinea pigs [21]. After 4 weeks, blood samples from fasting animals were obtained from the saphenous vein and collected in heparin tubes. Plasma from initial and final blood samples was separated by centrifugation as described earlier and stored at –80 °C until analysis. To assess the hypercholesterolemic effect of the diet, plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was determined fluorimetrically using enzymatic kits from BioVision (Milpitas, CA, USA). All of the procedures were approved by the University of Barcelona's animal care and use committee.

Preparation of oxidized plasma samples

Oxidized rat plasma (ORP) samples were obtained by thermal oxidation of URP. A determined amount of URP was diluted with an equal volume of 6 M GdnHCl in PBS and incubated at 80 °C for 1 h under continuous magnetic stirring (500 rpm). ORP samples were used immediately for analysis.

Reaction kinetics

Reaction time was studied by mixing 40 μ l of diluted ORP samples (equivalent to 20 μ l of plasma) with 160 μ l of 6 M GdnHCl in PBS containing 0.063% EDTA (final concentration in the medium of 0.025%), 100 μ l of 2 mM BHT in methanol, and 100 μ l of 400 μ M DPPP and 2 mM BHT in butanol. Then, samples were incubated at 40, 50, and 60 °C, and plasma HPs were determined as described earlier. All sample kinetic studies were conducted in triplicate.

Effect of antioxidant addition

The influence of EDTA and BHT addition on the reaction was assessed by using a two-factor four-level (4 \times 4) experimental design. First, 40 μ l of ORP samples (equivalent to 20 μ l of plasma) was diluted with 160 μ l of 6 M GdnHCl in PBS containing 0%, 0.0625%, 0.125%, or 0.25% EDTA (final concentrations in the medium of 0%, 0.0255, 0.05%, or 0.1%, respectively). Then, 100 μ l of 0, 2, 4, or 8 mM BHT in methanol was added (final concentrations in the medium of 0, 0.5, 1, or 2 mM, respectively). Samples were incubated at 40 °C for 3 h, and plasma HPs were determined as described earlier. The experiment was replicated four times.

Effect of sample amount

The optimal amount of sample volume was studied by determining the HPs of different amounts of ORP. Equivalent plasma volumes of 5, 10, 20, 30, 40, and 50 μ l were made up to 100 μ l with 6 M GdnHCl in PBS. Then, 100 μ l of 6 M GdnHCl in PBS containing 0.2% EDTA and 100 μ l of 4 mM BHT in methanol were added. Finally, 100 μ l of 400 μ M DPPP in butanol containing 4 mM BHT was added, and samples were then incubated for 3 h at 40 °C. Plasma HPs were determined as described earlier. The final concentrations of EDTA, BHT, and DPPP were 0.05%, 2 mM, and 100 μ M, respectively. Studies were conducted in triplicate.

5. DISCUSIÓN GENERAL

5.1. INTRODUCCIÓN A LA DISCUSIÓN

La evidencia indica que la elevada tasa de mortalidad asociada a las ECV en países desarrollados es debida a prácticas nutricionales poco saludables, como un elevado consumo de grasa y carbohidratos refinados, y un bajo consumo de frutas y vegetales. En consecuencia, las principales recomendaciones nutricionales incluyen cambios cuantitativos y cualitativos en la dieta, entre los que se encuentra un descenso del consumo de grasa y un aumento del consumo de fibra (World Health Organization (WHO), 2003). No obstante, tal y como se ha descrito en detalle en la introducción (*Véase apartado 1.5. Composición de la grasa y metabolismo lipídico: efecto de los ácidos grasos*) no todos los tipos de grasa presentan el mismo efecto sobre el metabolismo lipídico. Así mismo, las propiedades beneficiosas de la fibra alimentaria también pueden depender considerablemente de sus características físicas y químicas.

En base a esto, en el presente estudio se evaluó la capacidad hipolipidémica de fibras alimentarias con diferentes características fisicoquímicas. Más concretamente, se estudió en animales alimentados con dietas ricas en grasa (17 g grasa/100 g de pienso), el efecto de las fibras sobre la ganancia de peso, la excreción de lípidos y la concentración de lípidos plasmáticos y hepáticos. Como principal novedad en comparación a otros estudios, se ha evaluado el efecto de las fibras sobre la excreción de ácidos grasos (AG) y su repercusión sobre el perfil de AG de plasma e hígado, con la finalidad de tener un mayor conocimiento sobre el posible efecto ligando de grasa (*fat-binding*) selectivo de las fibras estudiadas. El estudio fue dividido en dos fases experimentales:

Primera fase experimental

En una primera fase experimental, se utilizaron dietas ricas en grasa (17%) y normocolesterolémicas (0,04% de colesterol) y se evaluó el efecto de dos polímeros obtenidos a partir de la hidrólisis química de la goma guar durante 1h o 2h (PHGG1 y PHGG2, respectivamente). Ambas fibras presentaron una viscosidad en solución acuosa propia de un fluido pseudoplástico, es decir, el gradiente de viscosidad decrece cuanto mayor es la velocidad de deformación. Sin embargo, su nivel de viscosidad fue diferente

en función del grado de hidrólisis, presentando una menor viscosidad cuanto mayor era el grado de hidrólisis (2884-184 y 1720-220 mPa para PHGG1 y PHGG2 respectivamente, disueltas en solución acuosa al 1% (p/v) y para velocidades de cizallamiento de 1-250s⁻¹). Por lo tanto, el tratamiento de hidrólisis química nos permitió comparar los efectos hipolipidémicos de dos gomas guar parcialmente hidrolizadas (PHGG) de similares características pero con diferente grado de viscosidad. En el estudio se incluyó también una maltodextrina resistente a la digestión (MD), ya que se trata de una fibra soluble al igual que las PHGG, pero que prácticamente no presenta viscosidad en solución acuosa (15 mPa·s en disolución acuosa al 30%, p/v) (Kishimoto et al., 2009; Sato et al., 2009). Adicionalmente, se estudiaron los efectos hipolipidémicos de un polímero de quitosano (CH) con un grado de desacetilación elevado (94%) y una viscosidad baja (23 mPa·s diluido en concentración 1% (p/v) en ác. acético 0,1M). Esta fibra presenta propiedades catiónicas únicas que la diferencian del resto de fibras, lo que hace pensar que sus mecanismos hipolipidémicos pueden ser diferentes al resto de fibras.

Segunda fase experimental

A partir de los resultados obtenidos y tras confirmar que el quitosano presentaba un mecanismo de acción diferente al del resto de fibras incluidas en el estudio, tal y como se discutirá más adelante, se planteó una segunda fase experimental. El principal objetivo de esta segunda fase fue corroborar los resultados observados en la primera fase experimental y, sobre todo, evaluar cómo las propiedades fisicoquímicas del quitosano, y en concreto su viscosidad, podían influir en sus propiedades hipolipidémicas y *fat-binding* específicas. Para ello se estudiaron dos polímeros de quitosano con un mismo grado de desacetilación (70%) pero con una viscosidad muy diferente. Su efecto se evaluó en animales alimentados con dietas con un elevado contenido de grasa (17%) e hipercolesterolémicas (0,2% de colesterol). De esta manera, el diseño permitía saber no sólo si las fibras podían disminuir los niveles de colesterol plasmático, sino también prevenir el incremento causado por una dieta rica en colesterol.

En el presente capítulo se discuten los principales resultados obtenidos, lo que permite tener un mayor conocimiento sobre los posibles mecanismos asociados al efecto hipolipidémicos de las fibras estudiadas.

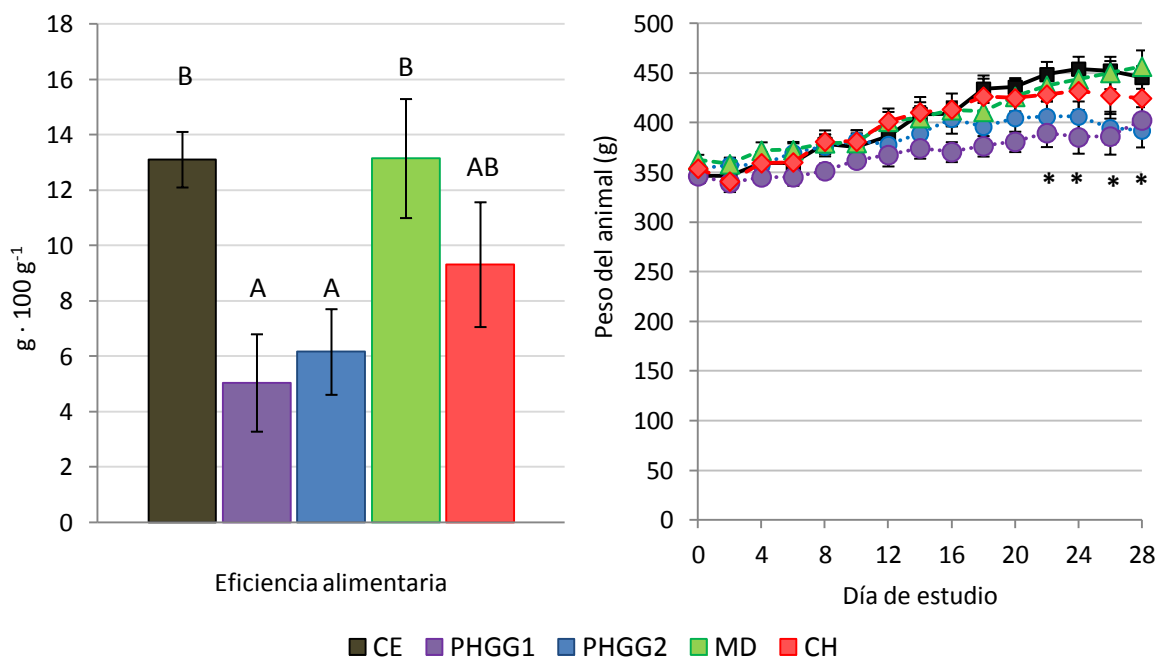
5.2. EFECTO SOBRE EL CONSUMO DE PIENSO Y PESO DEL ANIMAL

Los primeros resultados obtenidos en el estudio fueron los relativos al consumo de pienso y al crecimiento de cobayas alimentadas con los diferentes tipos de fibra.

Los resultados de la primera fase experimental mostraron que la adición de las fibras PHGG y MD no altera el consumo de pienso, hecho que coincide con estudios previos (Nagata & Saito, 2006; Yamada et al., 2003). Adicionalmente, se observa que los animales alimentados con PHGG, con independencia de su viscosidad dentro de los niveles estudiados, presentaron un menor incremento de peso (**Figura 5-1**). Este efecto resulta más evidente durante la última semana de estudio y es coherente con los resultados presentados por otros autores (Yamada et al., 2003). Por el contrario, el consumo de MD no influyó sobre la ganancia de peso tal y como también se ha descrito previamente (Nagata & Saito, 2006).

Por lo que respecta al quitosano, los resultados descritos en la bibliografía son contradictorios. Mientras que algunos estudios en animales muestran que el consumo de quitosano puede reducir la ganancia de peso del animal (Gallaher et al., 2002; Liu et al., 2008; Sugano et al., 1988), en otros no se ha observado tal efecto (Fukada et al., 1991; Ikeda et al., 1993; Simunek & Bartonova, 2005; Sugano et al., 1980). En la primera fase experimental se observó que la incorporación de quitosano a una dieta rica en grasa (17%) y normocolesterolémica (0,04% de colesterol) no afectó al consumo de pienso. La ganancia de peso fue ligeramente inferior al grupo control, pero no estadísticamente significativa.

Figura 5-1: Eficiencia alimentaria y evolución del peso de los animales (Primera fase experimental)

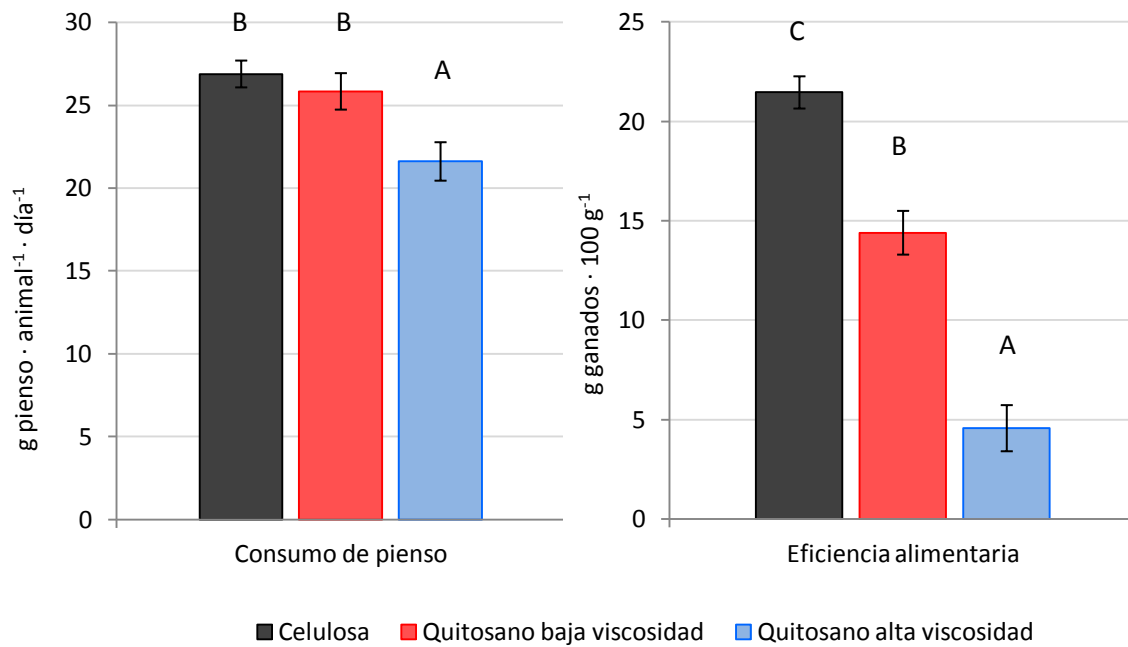


Abreviaciones: CE, celulosa; PHGG1, goma guar hidrolizada durante 1h; PHGG2, goma guar hidrolizada durante 2h; MD, maltodextrina resistente a la digestión; CH, quitosano.

No obstante, en la segunda fase experimental, donde los animales fueron alimentados con dietas hipercolesterolémicas (0,2% de colesterol), se observó una reducción de la eficiencia alimentaria tras el consumo de quitosano, tanto de baja (LV) como de alta viscosidad (HV), en comparación con el grupo control (**Figura 5-2**). Este hecho sugiere que el efecto del quitosano sobre el peso del animal podría ser más significativo cuando es consumido junto con dietas hipercolesterolémicas. Estos resultados coincidirían con los publicados previamente por Hossain et al. (2007) y concordarían con el hecho de que la mayoría de estudios donde se describe un efecto del quitosano sobre la ganancia de peso sean aquellos en los que se usan dietas ricas en colesterol (Liu et al., 2008; Sugano et al., 1988). Adicionalmente, los resultados obtenidos en la segunda fase experimental permiten observar que existe un claro efecto en función de la viscosidad del quitosano. A diferencia de lo observado con el LV, el consumo de HV produjo una disminución clara del consumo de pienso al igual que se ha observado en estudios previos (Deuchi et al., 1995a;

Gallaher et al., 2000). Este efecto puede atribuirse a una mayor sensación de saciedad, típicamente asociada a fibras de elevada viscosidad, ya que junto con los alimentos pueden formar una matriz o gel en el estómago y retrasar su vaciado (Howarth et al., 2001; Slavin, 2005). Este hecho explicaría parte del mayor efecto de HV sobre el peso de los animales.

Figura 5-2: Consumo de pienso y eficiencia alimentaria (Segunda fase experimental)



En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio y los publicados por otros autores, indican que factores tales como las características de la dieta y las propiedades fisicoquímicas del polímero de quitosano estudiado (principalmente el grado de desacetilación y la viscosidad) pueden afectar significativamente a su efecto sobre el peso. Este hecho podría explicar las discrepancias encontradas entre los resultados de las diferentes publicaciones presentes en la literatura.

5.3. EFECTO SOBRE LA EXCRECIÓN DE ESTEROLES NEUTROS Y ÁCIDOS BILIARES, Y REPERCUSIÓN SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

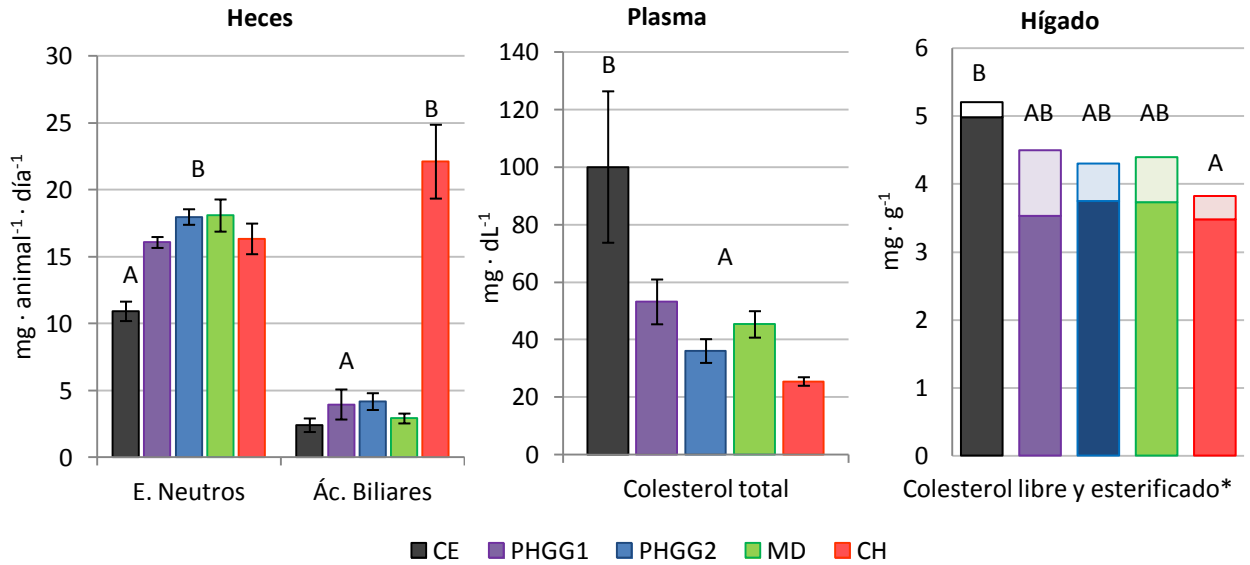
La PHGG, la MD y el quitosano son fibras alimentarias conocidas por sus propiedades hipolipídicas (Aranaz et al., 2009; Kapoor & Juneja, 2009; Kishimoto et al., 2009; Xia et al., 2011; Yoon et al., 2006). No obstante, los mecanismos asociados a su capacidad hipocolesterolémica no son del todo bien conocidos.

Los resultados del presente estudio confirman que el consumo de estas fibras puede reducir los niveles de colesterol plasmático, especialmente de colesterol LDL, y en consecuencia mejorar el índice aterogénico HDL/LDL. Las fibras estudiadas, y especialmente el quitosano, también presentan una tendencia a disminuir los niveles de colesterol en el hígado. Adicionalmente, en una segunda fase experimental donde los animales fueron alimentados con una dieta hipercolesterolémica, se observó que el quitosano puede además contrarrestar los efectos negativos sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de colesterol producidos por un elevado consumo de colesterol.

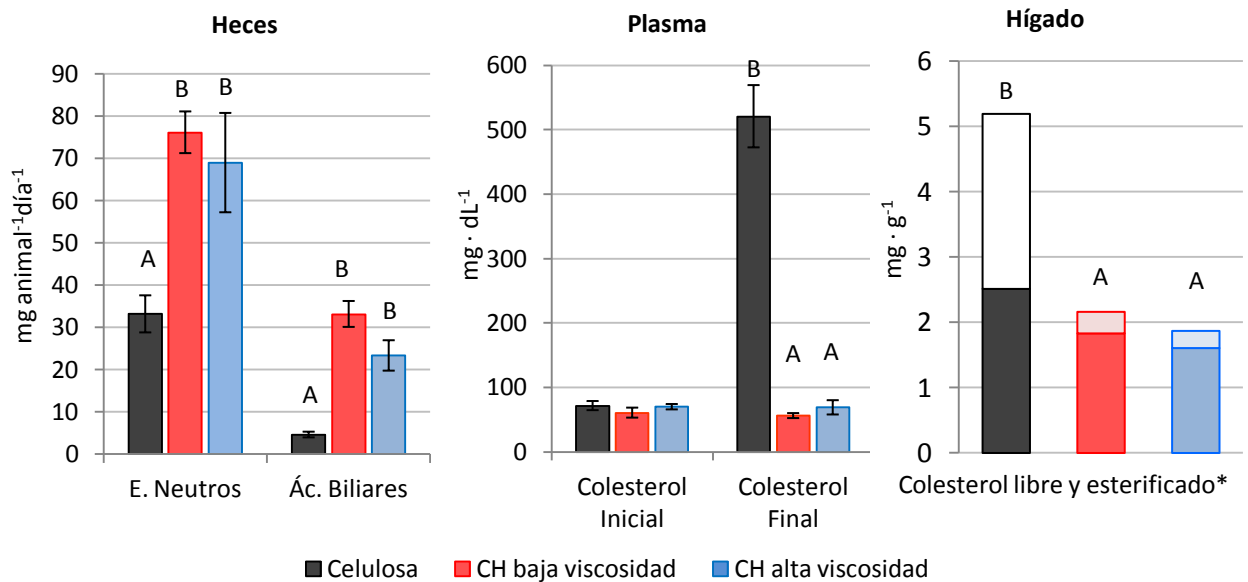
En general, se han propuesto diferentes mecanismos asociados a los efectos beneficiosos de la fibra alimentaria relacionados con el metabolismo del colesterol (Anderson et al., 2009; Chutkan et al., 2012; Gunness & Gidley, 2010; Marlett, 2001). En resumen, podrían agruparse en mecanismos relacionados con un aumento de la excreción de colesterol y ácidos biliares, y en mecanismos asociados a la modulación de la biosíntesis endógena de estos compuestos. Así por ejemplo, la goma guar es bien conocida como una fibra con capacidad hipocolesterolémica debido a su capacidad de aumentar la excreción tanto de colesterol como de ácidos biliares (Favier et al., 1997; Overton et al., 1994), propiedad que generalmente se atribuye a su elevada viscosidad. No obstante, se ha propuesto que la PHGG, cuya viscosidad es considerablemente inferior, puede mantener parte de los efectos beneficiosos de la goma guar (Yoon et al., 2008a).

Figura 5-3: Efecto de las fibras estudiadas sobre la excreción de esteroles y la concentración *in vivo* de colesterol.

Primera fase experimental



Segunda fase experimental



* La concentración de colesterol libre se indica con colores oscuros, mientras que la de colesterol esterificado se presenta en colores claros.

Abreviaciones: CE, celulosa; PHGG1, goma guar hidrolizada durante 1h; PHGG2, goma guar hidrolizada durante 2h; MD, maltodextrina resistente a la digestión; CH, quitosano.

Los presentes resultados confirman los presentados en otros estudios *in vitro* (Minekus et al., 2005) e *in vivo* (Favier et al., 1997) que muestran que la PHGG puede conservar la capacidad de incrementar la excreción de esteroides neutros. Sin embargo, el consumo de PHGG no incrementó de manera significativa la excreción de ácidos biliares, en buena correlación con los resultados previamente publicados por Favier et al. (1997). Los resultados revelan que el consumo de MD tiene un efecto similar al de la PHGG. Por el contrario, y tal y como también han demostrado otros autores, el quitosano puede incrementar la excreción tanto de esteroides neutros como de ácidos biliares (Gallaher et al., 2000).

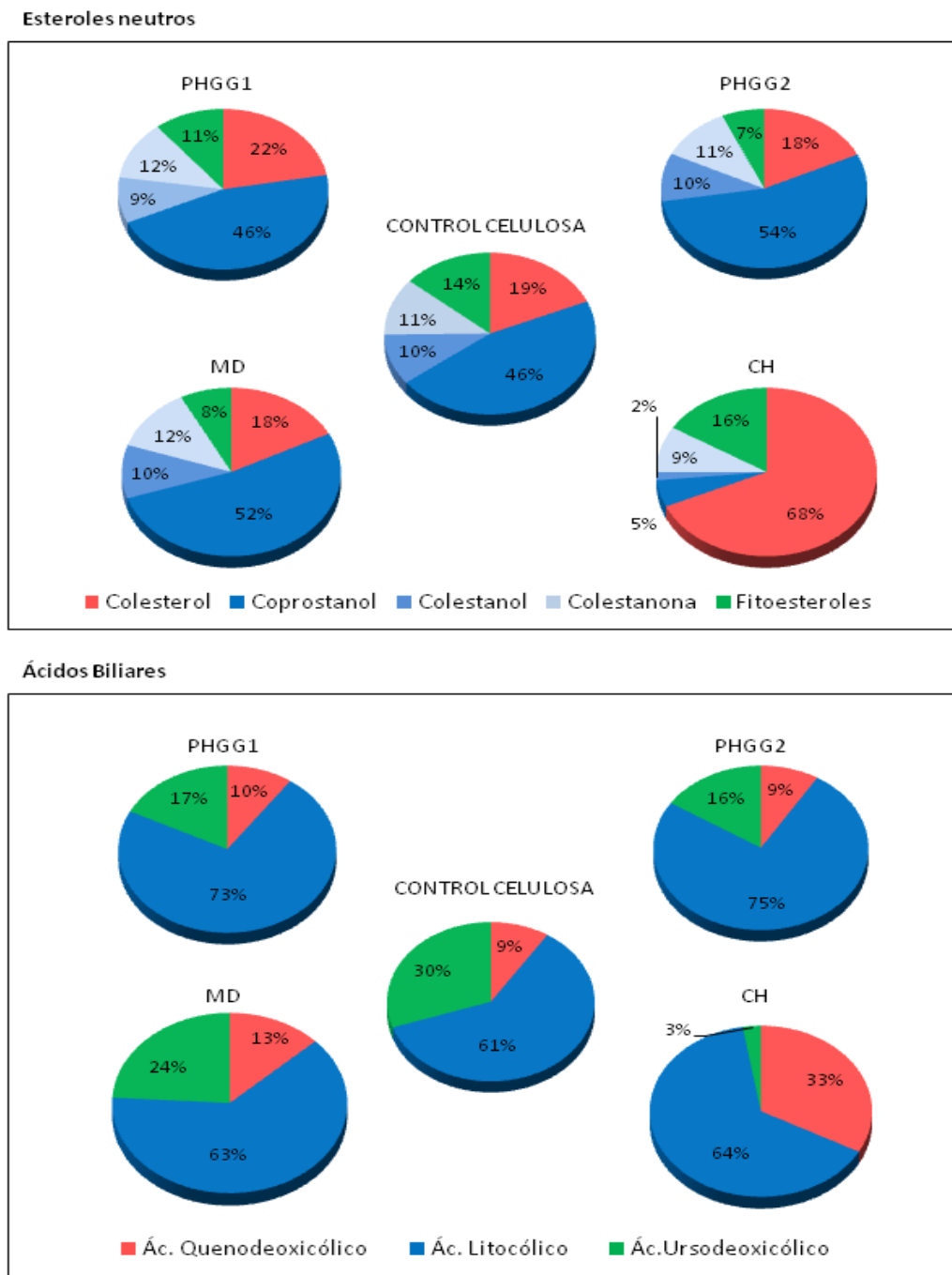
Otro de los objetivos del presente estudio fue determinar como el consumo de las fibras estudiadas podía afectar a la excreción de esteroides, no sólo desde un punto de vista cuantitativo, sino también cualitativo. Para ello, se realizó un estudio exhaustivo del perfil de los diferentes esteroides neutros y ácidos biliares presentes en heces mediante cromatografía de gases. En comparación a otros métodos más comúnmente utilizados por motivos prácticos, como los métodos enzimáticos (Allain et al., 1974; Porter et al., 2003; Sheltawy & Losowsky, 1975), la determinación por cromatografía de gases permite obtener resultados de gran interés para esclarecer el efecto de las fibras estudiadas sobre el metabolismo de los esteroides a nivel intestinal.

A nivel intestinal, el colesterol es metabolizado por la microbiota colónica, y tras diferentes procesos de oxidación e hidrogenación es transformado en coprostanol, principal esteroide neutro presente en las heces. Minoritariamente, pueden encontrarse otros productos intermedios como la coprostanona, la colestano y el colestanol (Lichtenstein, 1990). De manera similar, ácidos biliares primarios como el ácido cólico y el ácido quenodexocólico, los cuales son excretados junto con la bilis al lumen intestinal, son transformados en sus correspondientes metabolitos secundarios, ácido deoxicólico y ácido litocólico, respectivamente (Ridlon et al., 2006). El presente estudio revela que la capacidad hipocolesterolemica de las fibras solubles estudiadas, especialmente PHGG2 y MD, es principalmente atribuible a un aumento de la excreción de metabolitos secundarios de colesterol, como el coprostanol (**Figura 5-4**). Esto sugiere un aumento de

la bioconversión de colesterol a nivel intestinal, hecho que podría atribuirse a dos factores. En primer lugar, el consumo de estas fibras podría retrasar la absorción de colesterol, lo que incrementaría el tiempo de interacción con la microbiota durante su paso por el tracto intestinal. En segundo lugar, la bioconversión de colesterol podría verse favorecida por la fermentación intestinal de las fibras solubles estudiadas. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la PHGG y la MD son buenos sustratos para la actividad fermentativa de la microbiota intestinal (Flickinger et al., 2000; Ide et al., 1991; Pylkas et al., 2005; Takahashi et al., 1995). De hecho, estudios realizados en animales y en humanos, demuestran que el consumo de PHGG y MD puede incrementar el número de bacterias intestinales acidolácticas como *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. (Fastinger et al., 2008; Flickinger et al., 2000; Okubo et al., 1994; Takahashi et al., 1995). En consecuencia, el consumo de estas fibras conllevaría un aumento de la actividad bacteriana y, por lo tanto, una mayor bioconversión de esteroides a nivel intestinal. Es probable que el mayor efecto prebiótico de PHGG2 y MD, en comparación con PHGG1, sea atribuible a su menor viscosidad, ya que permitiría una mejor interacción con la microbiota intestinal. Además, es bien conocido que debido a la fermentación de la fibra se producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como el acetato, el propionato y el butirato (Gunniss & Gidley, 2010). Una mayor producción de propionato, que actúa como inhibidor de la HMG-CoA-red, podría también contribuir al efecto hipocolesterolemico de las fibras solubles estudiadas (Al-Lahham et al., 2010; Fava et al., 2006).

El consumo de polímeros de quitosano tuvo un efecto sobre el perfil de esteroides de las heces contrario al de las fibras solubles, ya que disminuyó de manera muy significativa la bioconversión tanto de colesterol como de ácido quenodeoxicólico a sus respectivos metabolitos secundarios. Este efecto corroboraría los resultados previamente publicados por Fukada et al. (1991) y puede atribuirse a la capacidad antimicrobiana del quitosano (Aranaz et al., 2009; Helander et al., 2001; Raafat & Sahl, 2009).

Figura 5-4: Efecto de las fibras estudiadas sobre el perfil de esteroles en heces (*Primera fase experimental*).



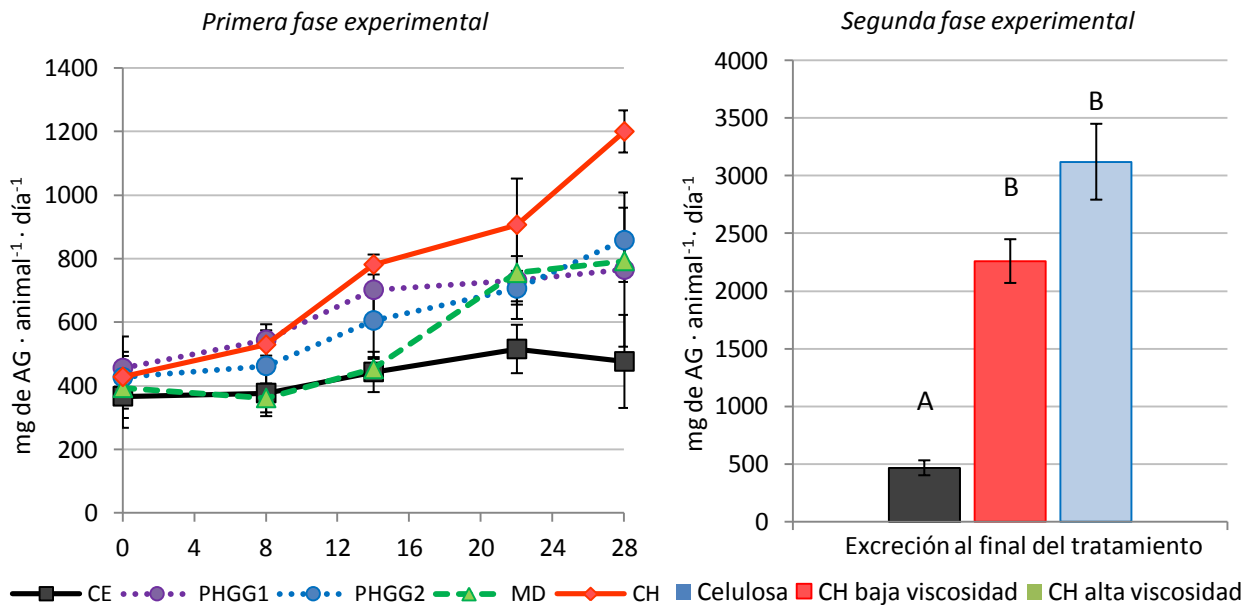
Abreviaciones: CE, celulosa; PHGG1, goma guar hidrolizada durante 1h; PHGG2, goma guar hidrolizada durante 2h; MD, maltodextrina resistente a la digestión; CH, quitosano.

5.4. EFECTO SOBRE LA EXCRECIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

La concentración de AG presentes en las heces se determinó mediante cromatografía de gases en base el método previamente descrito por López-López et al. (2000). Dicho método se consideró el más adecuado debido a que permite la determinación de todos los AG presentes en las heces independientemente de la forma en que se encuentren. Es decir, permite la cuantificación de AG tanto en forma de mono-, di- y triglicéridos, como aquellos en formas más complejas como, por ejemplo, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Además, al basarse en una *trans*-metilación directa de la muestra y no requerir una extracción previa de la grasa permite minimizar problemas de recuperación, hecho que puede ser especialmente relevante en matrices complejas como es el caso de las heces.

El consumo de todas las fibras experimentales estudiadas, y especialmente el de la fibra quitosano, aumentó la excreción total de AG en comparación al control celulosa (**Figura 5-5**).

Figura 5-5: Excreción total de ácidos grasos.

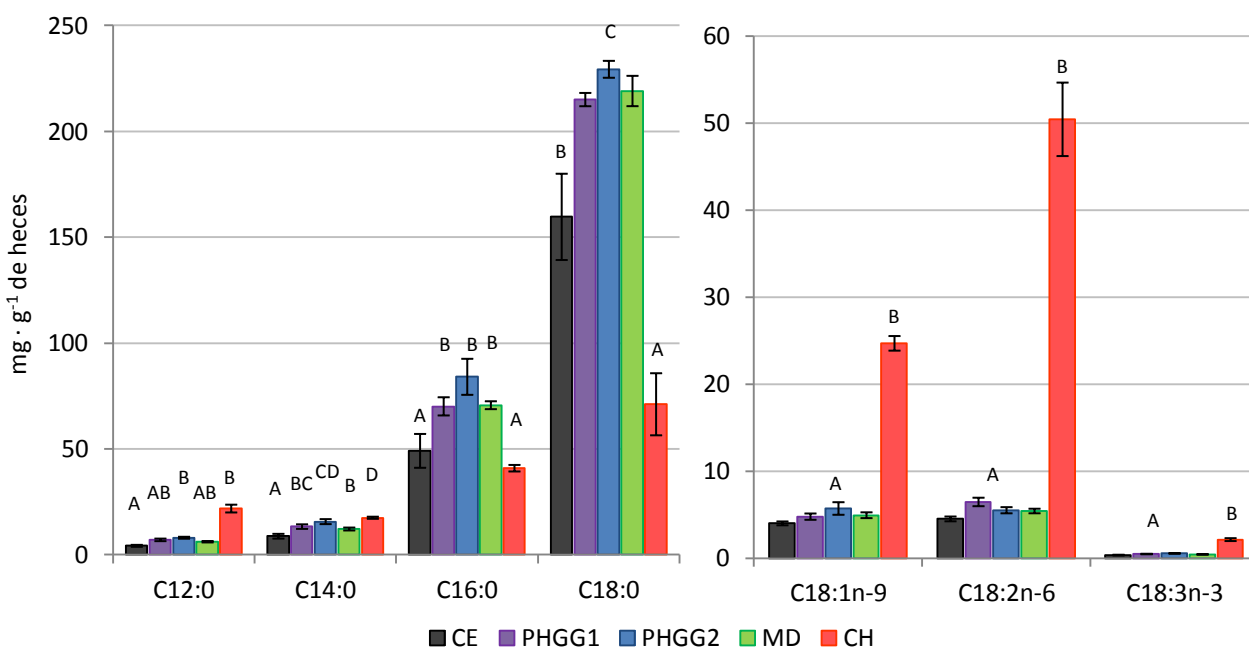


Abreviaciones: CE, celulosa; PHGG1, goma guar hidrolizada durante 1h; PHGG2, goma guar hidrolizada durante 2h; MD, maltodextrina resistente a la digestión; CH, quitosano

En el caso de las dos PHGG estudiadas y la fibra quitosano este efecto fue significativo trascurrida la primera semana de experimentación, mientras que en el caso de la MD lo fue transcurrido tres semanas. El efecto de las PHGG sobre la excreción total de AG fue independiente de su viscosidad. Por el contrario, en la segunda fase experimental se observó que en el caso de las fibras quitosano, un aumento en la viscosidad puede suponer una mayor excreción de AG. Este efecto es especialmente evidente si se tiene en cuenta que los animales alimentados con HV presentaron un consumo inferior de pienso.

El estudio detallado de la composición en AG de las heces permite obtener resultados de gran interés en relación a la capacidad “*fat-binding*” selectiva de las fibras estudiadas (Figura 5-6).

Figura 5-6: Excreción de los principales ácidos grasos presentes en la dieta (Primera fase experimental)



Abreviaciones: CE, celulosa; PHGG1, goma guar hidrolizada durante 1h; PHGG2, goma guar hidrolizada durante 2h; MD, maltodextrina resistente a la digestión; CH, quitosano.

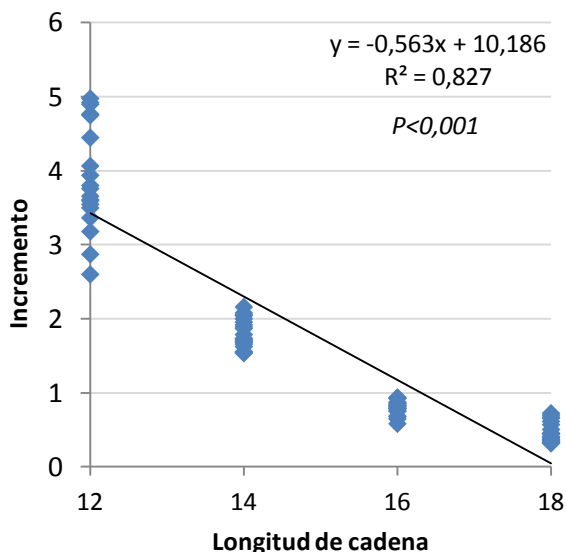
El consumo de las fibras solubles estudiadas (PHGG y MD) incrementó la excreción de todos los ácidos grasos saturados (AGS). Dicho efecto fue más evidente para AGS como el

palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0). Al igual que en estudios previos (Brufau et al., 2006), estos AG fueron los AGS más abundantes en las heces de todos los animales y su concentración fue muy superior en comparación a su presencia en los piensos. Este hecho podría atribuirse, al menos en parte, a su menor digestibilidad (Denke & Grundy, 1991; Jones et al., 1999; Schneider et al., 2000a), pese a que algunos autores han propuesto que las diferencias en la absorción de estos AGS es probablemente de una importancia biológica limitada (Baer et al., 2003). La excreción de todos los ácidos grasos insaturados (AGI) también tendió a incrementar tras el consumo de estas fibras, de manera que la relación de AGS/AGI no se vio alterada. En resumen, tras el consumo de las fibras solubles estudiadas se produjo un incremento generalizado de la excreción de AG. Cabe mencionar que parte de este efecto también podría atribuirse a un posible aumento de la cantidad de biomasa bacteriana en las heces debido a un efecto prebiótico (Achour et al., 2007; Cummings, 2001). No obstante, la contribución de este efecto en la excreción total de grasa suele ser de una magnitud considerablemente pequeña cuando se usan dietas con una elevada cantidad de grasa como las usadas en el presente estudio (Livesey, 2000).

Por el contrario, en aquellos animales alimentados con fibras quitosano se observó un cambio muy significativo en el perfil de AG de las heces en comparación con el control celulosa. En relación a la excreción de AGS, el consumo de quitosano incrementó especialmente la concentración de ácido laúrico (C12:0) y ácido mirístico (C14:0). No obstante, el quitosano presentó una menor afinidad por AGS de cadenas más largas. Es decir, se observó una correlación negativa entre la longitud de cadena de los AGS y la efectividad del quitosano de incrementar su excreción, tal y como se ejemplifica en el modelo de la **Figura 5-7**.

De hecho, en la primera fase experimental el consumo de fibra quitosano no incrementó significativamente la excreción de C18:0 en comparación con la celulosa. Dado que se trata del AGS más abundante en las heces de todos los grupos experimentales, este hecho supuso que la concentración total de AGS en las heces fuera inferior en los animales alimentados con quitosano en comparación con el resto de fibras.

Figura 5-7: Correlación entre el número de carbonos de los principales ácidos grasos saturados y el efecto del quitosano sobre su excreción



$$\text{Incremento} = \frac{Ech/Pch}{Ece/Pce}$$

Donde:

Ech= Concentración de AG en las heces del grupo quitosano

Pch= Concentración de AG en el pienso del grupo quitosano

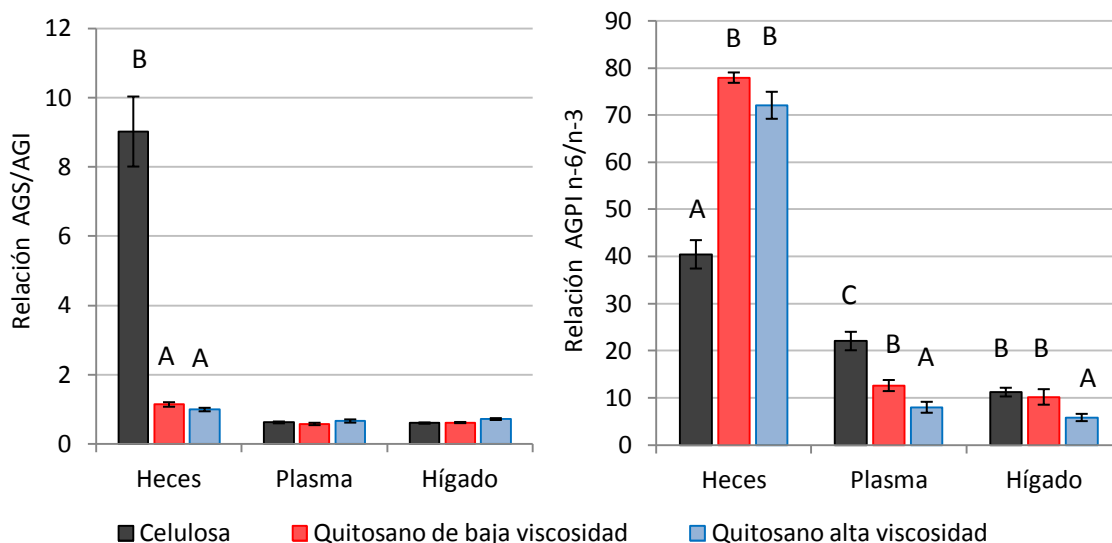
Ece= Concentración de AG en las heces del grupo celulosa

Pce= Concentración de AG en el pienso del grupo celulosa

Correlación utilizando todos los valores desde el día 4 al día 28 de la primera fase experimental (n=100). Los valores presentaron una buena correlación en base al coeficiente de correlación Pearson (P<0,001)

Por lo que respecta a los AGI, el quitosano produjo un gran incremento de la excreción tanto de AGMI como poliinsaturados AGPI. En consecuencia, la relación de AGS/AGI en las heces de animales alimentados con quitosano fue considerablemente inferior que en aquellos alimentados con pienso control (**Figura 5-8**). No obstante, cabe destacar que esta reducción se debió principalmente al descenso de la concentración de C18:0 que, al contrario de otros AGS como el C12:0 y el C14:0, es considerado metabólicamente neutro por lo que respecta al metabolismo del colesterol (Fernandez & West, 2005). La relación de AGPI n-6/n-3, también se vio significativamente alterada por el consumo de quitosano, debido a que aunque se incrementó la excreción tanto de ácido α -linolénico (ALA, C18:3n-3) como linoleico (LA, C18:2n-6), la magnitud del efecto fue superior para este último.

Figura 5-8: Relación de ácidos grasos saturados/insaturados y n-6/n-3 en heces plasma e hígado (Segunda fase experimental)



En conclusión, los resultados revelan que la fibra quitosano presenta capacidad *fat-binding* selectiva *in vivo*. Esta propiedad se corroboró en la segunda fase experimental, donde además se observó que es independiente de la viscosidad del polímero de quitosano. En consecuencia, resulta de gran interés estudiar cómo esta capacidad *fat-binding* selectiva del quitosano puede afectar al perfil lipídico de diferentes tejidos.

5.5. EFECTO SOBRE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE PLASMA E HÍGADO

En base a los resultados sobre la capacidad *fat-binding* selectiva del quitosano, se cuestionó de qué manera este efecto podría repercutir sobre el perfil de AG en plasma e hígado de los animales.

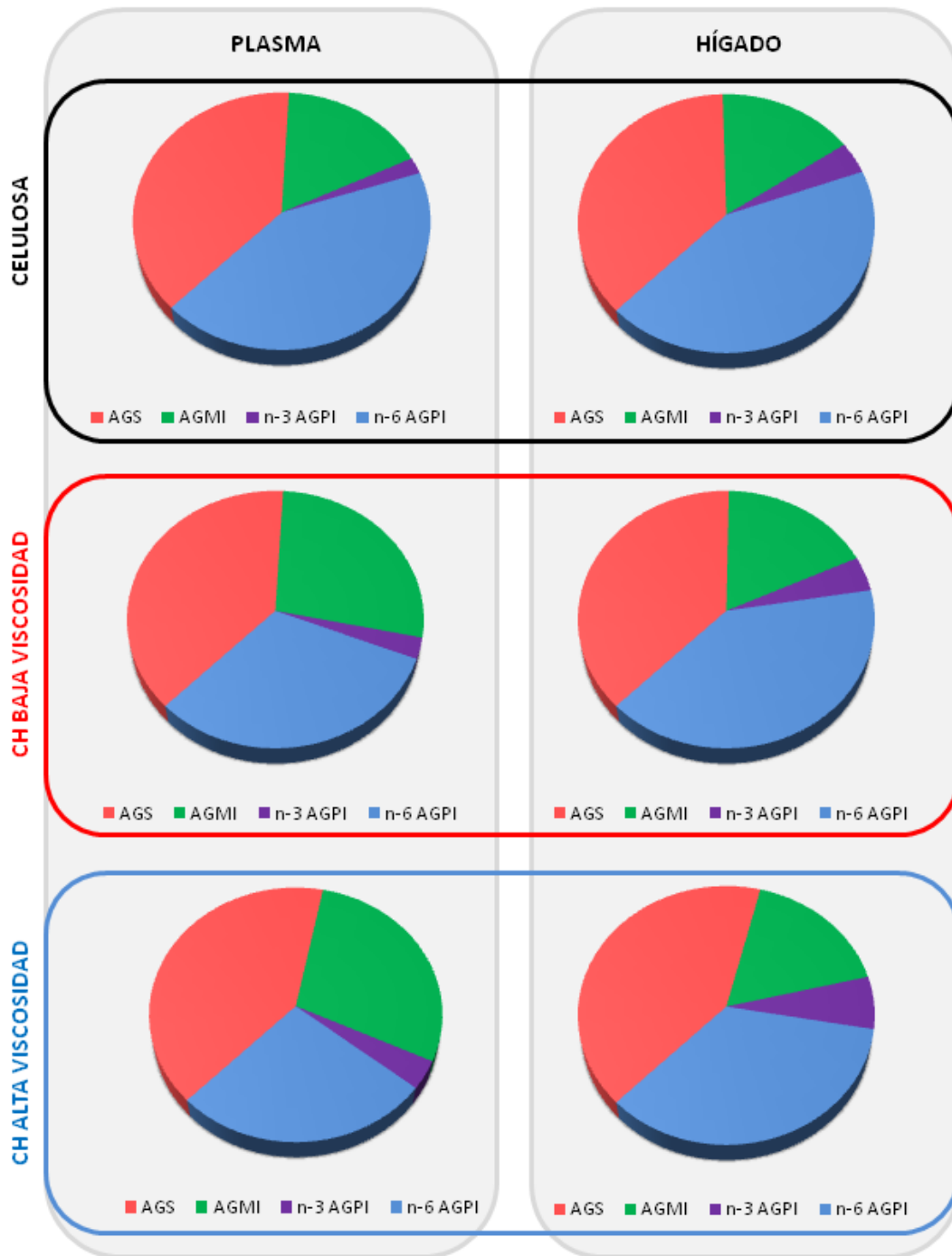
Como se ha discutido con anterioridad, en los animales alimentados con quitosano la excreción total de AGS fue considerablemente inferior en comparación con la de AGI. Este hecho sugiere una absorción de AGS, especialmente la de C18:0, proporcionalmente superior a la de AGI. De esta manera cabría esperar que la proporción de AGS en plasma e hígado fuese superior en los animales alimentados con quitosano. No obstante, tanto en la primera como en la segunda fase experimental se observó que la proporción de AGS se mantuvo considerablemente constante en plasma e hígado suponiendo un porcentaje de entre el 32-40% en ambas fases experimentales. Más concretamente, pese a que el efecto del quitosano sobre la excreción de AGS fue diferente en función de la longitud de cadena, el porcentaje² en el cual los principales AGS estaban presentes en plasma e hígado no presentó grandes cambios. Por lo tanto la relación AGS/AGI en plasma e hígado no se vio significativamente alterada por el consumo de quitosano como se pudo observar en ambas fases experimentales y para los diferentes polímeros, independientemente de su viscosidad (**Figura 5-8**).

Por el contrario, se observaron cambios significativos en el perfil de AGI en aquellos animales alimentados con quitosano, especialmente en la relación de AGPI n-6 y n-3. En concreto, el incremento de la relación entre AGPI n-6 y n-3 observado en heces, correlacionó con un descenso de dicha relación en el plasma de los animales alimentados con quitosano. El mismo efecto se observó en el perfil de AG en hígado, especialmente en aquellos animales alimentados con fibra quitosano de elevada viscosidad (HV). En todos

² De manera general, en el presente apartado se hace referencia a cambios en el porcentaje o concentración relativa de AG (g de AG/ 100 g AG totales). No debe confundirse con el concepto de concentración tal y como se usa en las publicaciones (g de AG/ g o mL de muestra), ya que la ausencia de cambios en el porcentaje de AG no necesariamente implica que no los haya en la concentración de AG.

los casos, dicho efecto se debió principalmente a un elevado descenso de la concentración relativa de LA en comparación con la concentración ALA.

Figura 5-9: Porcentaje de ácidos grasos en plasma e hígado (*Segunda fase experimental*)



Abreviaciones: AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados.

La diferente respuesta de la concentración relativa *in vivo* de los AG puede explicarse en base a diferentes hipótesis. Los resultados de estudios previos demuestran que la correlación entre el consumo de AG y su presencia en tejidos puede variar considerablemente en función del tipo de AG. En uno de los artículos de revisión más exhaustivos publicados hasta el momento se evidencia que, en general, el ratio AGS/AGI no puede ser considerado un buen biomarcador del consumo de AG de la dieta (Hodson et al., 2008).

Por el contrario, numerosas investigaciones demuestran que la concentración *in vivo* de AGPI n-6 y n-3, como el LA y el ALA, presenta una buena correlación con su consumo (Andersen et al., 1996; Orton et al., 2008; Zock et al., 1997). Este hecho se atribuye principalmente a su condición de ácidos grasos esenciales debido a la incapacidad del organismo de sintetizarlos (Sprecher, 2003). En consecuencia, la presencia de estos AGPI en el organismo es totalmente dependiente de su consumo a través de la dieta. Por el contrario, diferentes autores coinciden en afirmar que las concentraciones *in vivo* de AGMI y sobre todo de AGS presentan una menor correlación con su consumo a través de la dieta debido a que su presencia en los tejidos no es exclusivamente dependiente de su presencia en la dieta (Poppitt et al., 2005; Zock et al., 1997). Así, por ejemplo, la síntesis *de novo* de AG (lipogénesis) a partir de los precursores acetil-CoA y malonil-CoA mediada por la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa, permite la producción de C16:0, y en menor medida de C14:0 y C18:0 (Chirala & Wakil, 2004; Volpe & Vagelos, 1976; Wakil et al., 1983). La β -oxidación o la elongación de estos AG también puede dar lugar a cambios en la concentración de los diferentes AGS (Rioux et al., 2007; Vemuri & Kelley, 2007). Adicionalmente, la acción de enzimas como la esteroil-CoA desaturasa (SCD1), una delta-9 desaturasa involucrada en la síntesis de AGI, puede influir en la concentración endógena tanto de AGS como de AGMI, por ejemplo mediante la producción de ácido palmitoleico (C16:1n-7) y C18:1n-9 a partir de C16:0 y C18:0 respectivamente (Ntambi, 1992; Rhee et al., 1997). De esta manera, un posible descenso de las concentraciones en plasma o hígado de C18:1n-9 debido a una mayor excreción en animales alimentados con quitosano

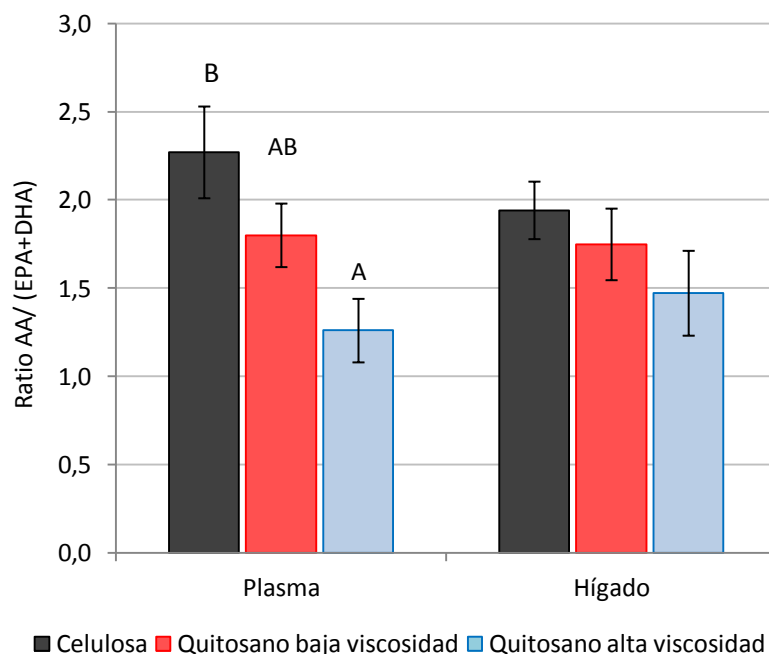
podría ser compensado por una mayor síntesis endógena, que a su vez, permitiría la regulación de las concentraciones de C18:0.

Estas hipótesis han sido recientemente confirmadas en un estudio realizado por Abbot, et al. (2012), donde los autores determinaron el efecto de una amplia variedad de dietas con un perfil lipídico muy diferente sobre el perfil de AG de varios tejidos. Los resultados del estudio demostraron que tanto en el plasma como en el hígado se observa una menor respuesta a cambios en el perfil lipídico de la dieta en comparación a tejidos relacionados con la reserva de energía, como el tejido adiposo. De hecho, el tejido adiposo es considerado el mejor biomarcador de AG de la dieta (Hodson et al., 2008). Los resultados del estudio también revelaron que la proporción de AGS, y por lo tanto de AGI, se mantenía considerablemente constante pese a los grandes cambios existentes en el perfil lipídico de la dieta.

En base a esto, se deduce que el balance entre AGS y AGI está fuertemente regulado a nivel metabólico, muy probablemente para evitar las consecuencias funcionales que podrían conllevar alteraciones en esta relación. Este hecho es especialmente evidente en lípidos de membrana como, por ejemplo, los fosfolípidos (Clamp et al., 1997), ya que resulta crítico mantener un grado de insaturación óptimo para mantener una fluidez y funcionalidad metabólica adecuadas (Berdanier, 2007). Este mecanismo de regulación es conocido como “adaptación homeoviscosa” (*homeoviscous adaptation*) y permite el mantenimiento de la fluidez de membrana regulando el grado de insaturación (Sinensky, 1974). Dado que la composición lipídica de la membrana es específica de cada especie, es probable que esta regulación se produzca a nivel genético (Abbott et al., 2012). De esta manera, el grado de insaturación de las membranas se mantiene constante ante factores externos como, por ejemplo, el perfil lipídico de la dieta.

En resumen, la capacidad *fat-binding* selectiva del quitosano puede alterar el perfil de AG de plasma e hígado, pese a que este efecto parece repercutir solamente sobre el perfil de AGPI n-6 y n-3. Tal y como se ha explicado en detalle con anterioridad (*Véase apartado 1.5.4. Ácidos grasos poliinsaturados*) la homeostasis entre los AGPI n-6 y n-3 está estrechamente relacionada con la regulación de procesos inflamatorios y patologías asociadas, entre las que se encuentran la aterosclerosis. En base a los resultados observados en el presente estudio se podría especular que el consumo de CH podría ser beneficioso para reducir o contrarrestar los efectos adversos de dietas con una elevada relación n-6/n-3. Partiendo de esta hipótesis y a partir de los datos obtenidos en la segunda fase experimental, en la **Figura 5-10** se muestra como el consumo de quitosano puede afectar a la relación entre el ácido araquidónico (AA, C20:4n-6), como ejemplo de principal AG precursor de prostaglandinas y leucotrienos pro-inflamatorios; y los ácidos eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-6) y docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) como ejemplo de principales precursores de resolvinas y lipoxinas anti-inflamatorias.

Figura 5-10: Concentración de ácido araquidónico en relación a los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico (*Segunda fase experimental*)



Se puede observar como el consumo de los polímeros de quitosano, especialmente de elevada viscosidad, reduce significativamente esta relación en plasma y presenta una tendencia similar en hígado, lo que podría tener un efecto beneficioso en la prevención de desórdenes asociados a la inflamación.

No obstante, sería necesario realizar estudios en profundidad para evaluar las posibles implicaciones de estos efectos, por ejemplo mediante la determinación de metabolitos asociados a los procesos inflamatorios como citoquinas, prostaglandinas, leucotrienos, resolvinas, etc. En relación a este aspecto, recientemente se ha publicado que el consumo de quitosano puede disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α (Chung et al., 2012), pero resulta cuestionable si este efecto es atribuible a cambios en la relación n-6/n-3. Además, es importante tener en cuenta diferentes aspectos del diseño experimental de la presente Tesis. En primer lugar, en ambas fases experimentales se han utilizado dietas con una elevada concentración de LA y podría ser cuestionable si los efectos del quitosano podrían extenderse a dietas con una composición lipídica diferente. Sería especialmente relevante el caso de dietas con una baja concentración en AG esenciales ya que el quitosano puede reducir considerablemente la absorción de LA pero también la de ALA. Por lo tanto, en este tipo de dietas sería importante evaluar si el consumo de quitosano, especialmente en elevadas concentraciones o en tratamientos prolongados, podría conllevar una deficiencia de AG esenciales. Con dicha finalidad es probable que se requiera la realización de estudios con un tiempo de tratamiento superior, debido a que se ha reportado que los síntomas de una deficiencia de AG esenciales en otros animales de experimentación (p.ej. ratas) pueden tardar en manifestarse hasta 3 meses aproximadamente (Holman, 1988). Es por ello que generalmente se recomienda que la reducción de la relación n-6/n-3 se realice mediante un incremento de AGPI n-3 (Bays et al., 2008; Chilton et al., 2008) y especialmente de EPA y DHA, ya que la síntesis a partir de sus precursores es poco eficiente (Das, 2006).

5.6. EFECTO DEL CONSUMO DE QUITOSANO SOBRE EL NIVEL DE OXIDACIÓN DEL PLASMA

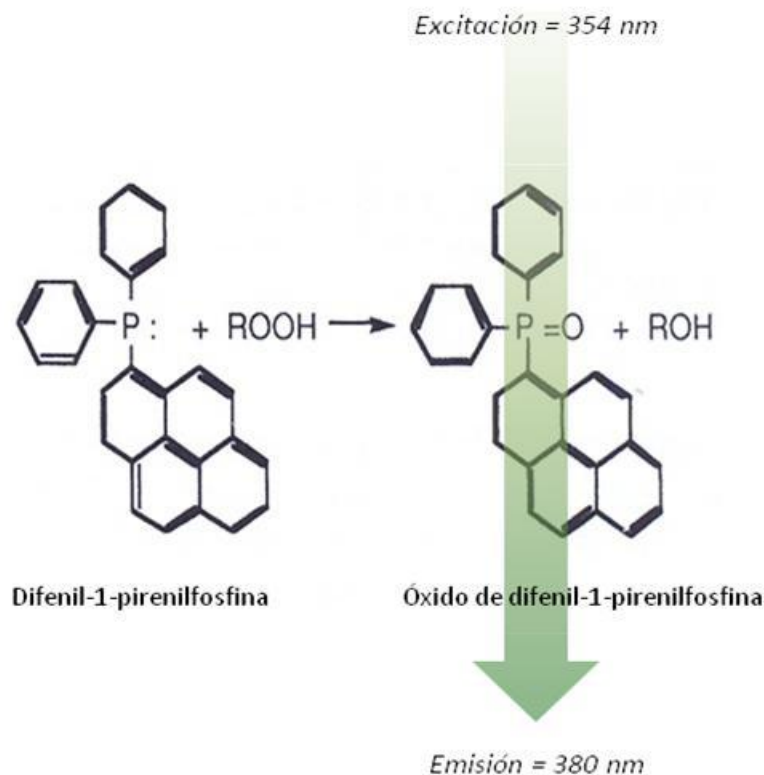
El estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de numerosas patologías entre las que se incluye la aterosclerosis (Stocker & Keaney Jr., 2004; Sugamura & Keaney Jr., 2011). El grado de estrés oxidativo depende de factores tales como la concentración y el perfil de lípidos, así como de la presencia de compuestos antioxidantes, como por ejemplo vitaminas liposolubles. La concentración de estos compuestos podría verse afectada por el consumo de fibras alimentarias que redujesen la absorción de lípidos y en consecuencia resulta de gran interés evaluar el posible efecto que pudiese tener su consumo sobre los niveles de oxidación.

Los niveles de oxidación en plasma son considerados un buen biomarcador de estrés oxidativo (Thérond et al., 2000) y por lo tanto en los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar métodos que permitan la determinación de productos de oxidación en este tipo de muestra (Akasaka et al., 1995; Draper et al., 1993; Gay & Gebicki, 2003; Holley & Slater, 1991; Jessup et al., 1994). No obstante, los métodos desarrollados hasta la fecha presentan carencias de sensibilidad, especificidad y/o requieren de una instrumentación sofisticada. Además, la mayoría de estos métodos se centran exclusivamente en el análisis de compuestos de oxidación de naturaleza lipídica, si bien en los últimos años se ha visto que la oxidación de las proteínas también puede tener un papel importante en diferentes patologías como ECV (Cecarini et al., 2007; Gebicki, 1997; Stadtman, 2006).

En base a esto, para el presente estudio se puso a punto un nuevo método que permitiese la determinación de manera cuantitativa, simple, sensible y específica de los hidroperóxidos (HP) totales presentes en plasma, es decir, tanto de aquellos de naturaleza lipídica como proteica. El método consiste en el uso de las propiedades fluorimétricas del fluoróforo difenil-1-pirenilfosfina (DPPP). Se trata de un reactivo que en su forma no oxidada no emite fluorescencia, pero que al ser oxidado de manera específica por los HP

de la muestra emite fluorescencia a una longitud de onda de 380 nm (Akasaka & Ohru, 2000).

Figura 5-11: Propiedades fluorimétricas de la difenil-1-pirenil fosfina (DPPP).



Las principales características del método desarrollado se describen en la siguiente tabla:

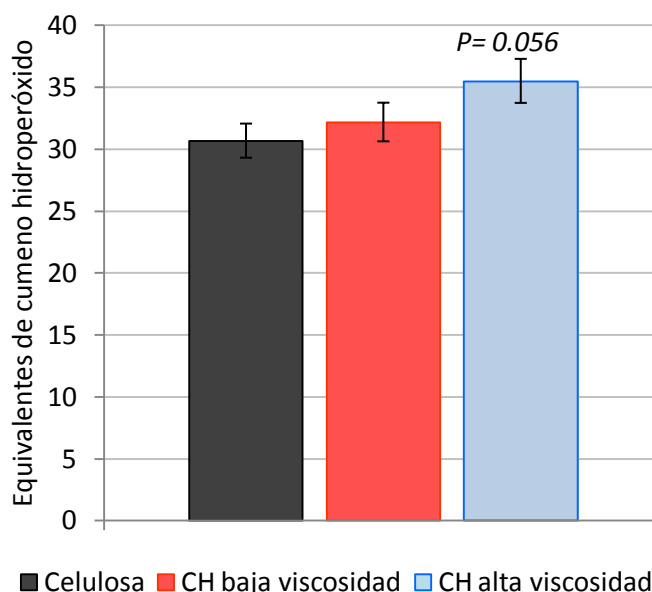
Tabla 5-1: Propiedades del método de determinación de hidropéroxidos totales en plasma mediante el fluoróforo difenil-1-pirenilfosfina

Límite de detección:	0,08 nmoles
Límite de cuantificación:	0,25 nmoles
Rango de linealidad:	0,25 – 8 nmoles
Coefficiente de variación¹:	5,2 %
Recuperación:	90-92%
Especificidad:	> 96%
Volumen de plasma:	40 µL
Tiempo de reacción:	3 h.
Otras ventajas:	Minimiza la formación artificial de HP Minimiza la pérdida de HP poco estables de la muestra Permite la determinación de HP lipídicos y proteicos

¹Coefficiente de variación para una concentración en plasma de equivalentes de hidropéroxido de cumeno de 14,5 µM (n=8)

En base a los criterios de validación de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1993) el método puede considerarse una alternativa válida a los métodos analíticos existentes hasta el momento. Partiendo de esta base, el método fue utilizado en la segunda fase experimental para evaluar el grado de oxidación plasmática de los animales alimentados con celulosa o con fibras quitosano. Aquellos animales alimentados con HV presentaron unos niveles de HP plasmáticos ligeramente superiores a los alimentados con CE, pese a que los resultados no fueron estadísticamente significativos.

Figura 5-12: Concentración de hidroperóxidos totales en plasma (Segunda fase experimental)



Estos resultados pueden considerarse sorprendentes teniendo en cuenta que la concentración de lípidos en plasma fue muy inferior en aquellos animales alimentados con quitosano. No obstante, existen en la bibliografía diferentes publicaciones que apuntan en la misma dirección. Hossain et al. (2007) describieron que la concentración de peróxidos en hígado era superior en aquellos animales alimentados con quitosano. Los autores atribuyeron tales observaciones a una correlación con el aumento de la relación AGI/AGS observado en plasma, aunque no proporcionaron ninguna explicación que justificase el cambio de esta relación. En nuestro estudio la relación de AGI/AGS no sólo no fue alterada

ni en plasma ni en hígado, sino que en base a la mayor excreción de AGI que de AGS observada en las heces de los animales alimentados con quitosano, cabría esperar que de producirse algún cambio fuese probablemente el opuesto. Por lo tanto es, poco probable que un cambio en el perfil lipídico del plasma o el hígado de los animales sea la principal causa de unos niveles de oxidación superiores. En un estudio realizado con fibras quitosano de diferente viscosidad Chiang et al. (2000) describieron que tras el consumo de fibra quitosano de mayor viscosidad el hígado de los animales presentaba unos niveles de oxidación secundaria superiores. La misma tendencia se observó para los niveles de oxidación en plasma. Los autores atribuyeron este efecto a una menor absorción de compuestos antioxidantes como algunas vitaminas liposolubles, ya que un descenso en la absorción de grasa podría afectar a su biodisponibilidad. De hecho, diferentes publicaciones han descrito que el consumo de quitosano puede disminuir la absorción de vitaminas con reconocida capacidad antioxidante, como la vitamina E (Deuchi et al., 1995b; Vrzhesinskaya et al., 2011; Yao et al., 2010) y la vitamina B2 (Rodrigues & De Oliveira, 2012). Teniendo en cuenta la mayor viscosidad de la fibra HV y su elevado efecto sobre la absorción de grasa, resulta lógico pensar que su consumo pueda interferir en la absorción de este tipo de vitaminas y, en consecuencia, afectar negativamente sobre los niveles de oxidación en plasma. Este hecho remarca la importancia de valorar no sólo los posibles efectos beneficiosos de fibras alimentarias como el quitosano sino también sus posibles efectos adversos, sobre todo cuando son consumidas durante un largo periodo de tiempo o en cantidades elevadas. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio no fueron suficientemente concluyentes por lo que debería ser un aspecto a tener en cuenta en futuros estudios.

5.7. MECANISMOS ASOCIADOS AL EFECTO HIPOLIPIDÉMICO DE LAS FIBRAS ESTUDIADAS

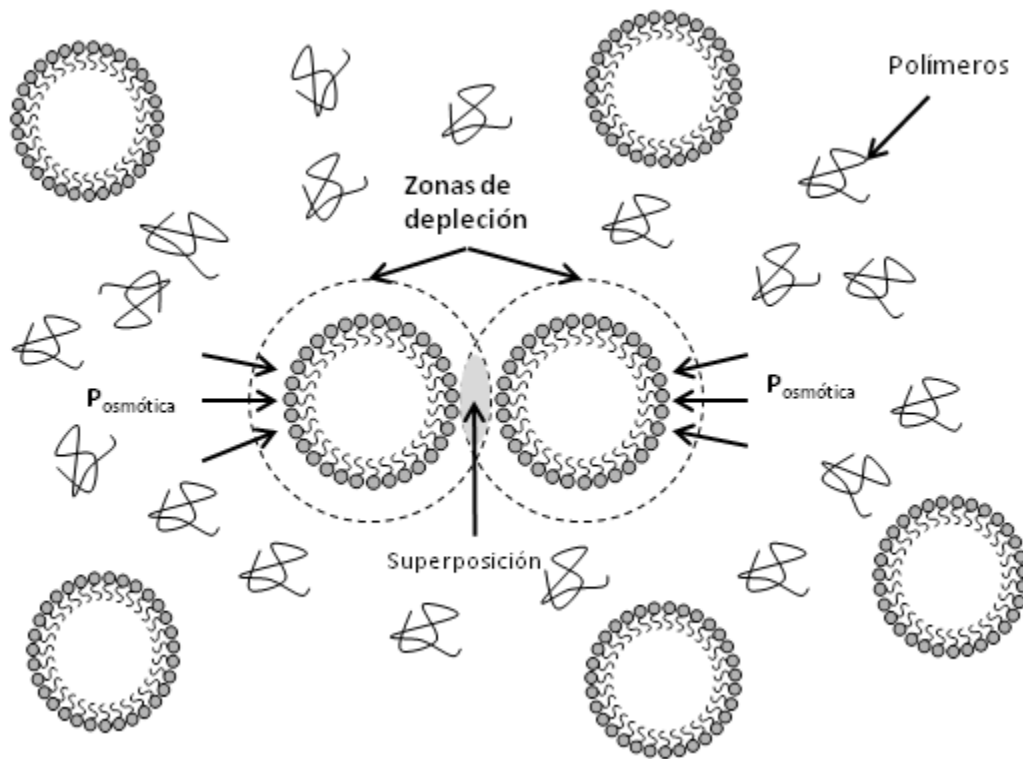
Los efectos beneficiosos de la fibra alimentaria dependen, al menos en parte, de propiedades físicas como la solubilidad y la viscosidad. Tradicionalmente, las propiedades hipolipidémicas de las fibras solubles (capaces de disolverse en agua) se han atribuido a su capacidad de incrementar la viscosidad a nivel intestinal. Como resultado se puede producir una reducción de la digestibilidad y la absorción de la grasa procedentes de la dieta. El aumento de la viscosidad a nivel intestinal también puede afectar a la capacidad emulsionante de los ácidos biliares y disminuir su reabsorción en el íleon. La eliminación de ácidos biliares a través de las heces conlleva que deban sintetizarse más ácidos biliares en el hígado a partir del colesterol endógeno, disminuyendo en consecuencia los niveles de colesterol plasmático, especialmente colesterol LDL (Chutkan et al., 2012).

En base a este mecanismo, es lógico que frecuentemente se haya considerado que la viscosidad sea un factor necesario para disminuir la absorción de grasa, y que cuanto mayor sea la viscosidad de la fibra mayor será su capacidad hipocolesterolémica (Anderson et al., 2009; Chutkan et al., 2012). No obstante, aunque se trata de una hipótesis bastante aceptada, no está libre de controversia. En primer lugar, se ha publicado que un aumento de la viscosidad no necesariamente se traduce en un beneficio fisiológico mayor (Ellis et al., 1991; Gallaher et al., 1993a). De hecho, en el presente estudio, las dos fibras goma guar hidrolizadas químicamente mostraron una capacidad hipolipidémica similar con independencia de su viscosidad. Adicionalmente, diversos estudios han publicado que fibras como la goma guar hidrolizada enzimáticamente (Minekus et al., 2005; Yoon et al., 2006; Yoon et al., 2008b) o la maltodextrina resistente a la digestión (Kishimoto et al., 2009; Sato et al., 2009) también poseen capacidad hipolipidémica *in vivo* pese a tratarse de fibras solubles no viscosas.

En consecuencia, por lo que respecta a la capacidad hipolipidémica de algunas fibras solubles la viscosidad no es una característica imprescindible. De manera no necesariamente excluyente, deben existir otros mecanismos que también sean

responsables o que contribuyan a la actividad hipolipidémica de estas fibras. En el caso de las fibras solubles PHGG y MD, se observó que su consumo no alteró el perfil de AG de las heces, de lo que se deduce que su efecto hipolipidémico debe estar asociado a mecanismos que afecten a la digestibilidad de la grasa de la dieta de forma no selectiva. En base a un estudio *in vitro*, Minekus et al. (2005) propusieron que el mecanismo más probable por el cual la PHGG puede reducir la absorción de lípidos estaría relacionado con un fenómeno de floculación por depleción (*depletion-flocculation mechanism*) al igual que otras fibras como la pectina (Beysseriat et al., 2006) (Figura 5-13).

Figura 5-13: Esquema de mecanismo de floculación por depleción



Este mecanismo es característico de polímeros que no presentan propiedades de adsorción y que por lo tanto no pueden interactuar y adherirse a la superficie de las gotas de grasa de una emulsión (Blijdenstein, 2003). En consecuencia, cuando dos gotas de grasa se acercan a una distancia menor que el diámetro libre del polímero, éste es desplazado del hueco que queda entre ellas. Por lo tanto, se produce un aumento de la

concentración de los polímeros alrededor de las gotas de grasa, lo que genera una presión osmótica que propicia que las gotas se agreguen y floclen. Como resultado, se reduce la capacidad emulsionante de los ácidos biliares y por lo tanto la biodisponibilidad de grasa y colesterol, sin que por ello la excreción de ácidos biliares deba verse afectada.

Por lo que respecta a la MD, Kishimoto et al. (2009) propusieron que su mecanismo de acción podría estar asociado a un aumento de la estabilidad de las micelas, hecho que reduciría o retrasaría la liberación de AG.

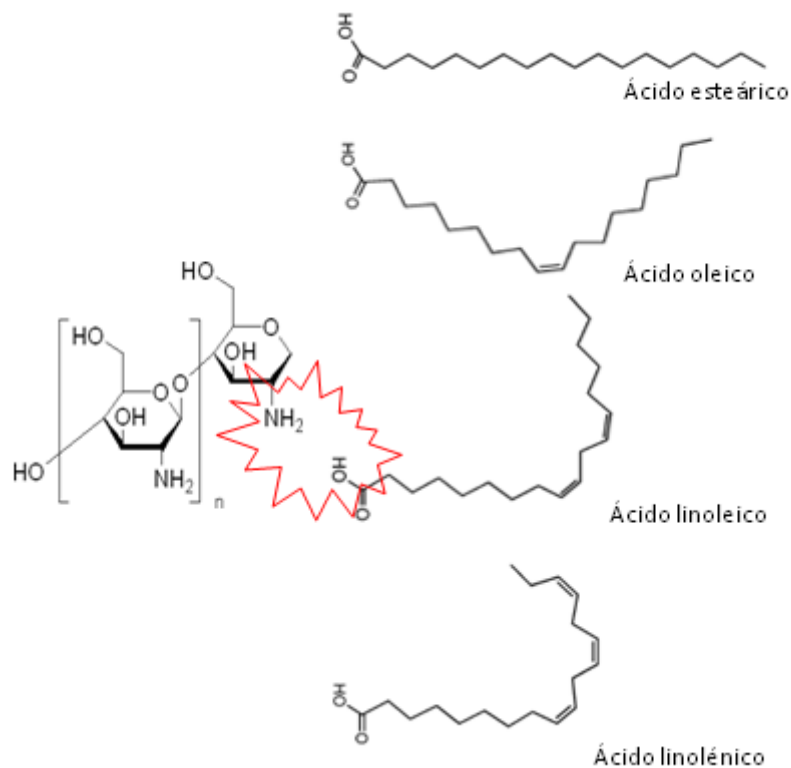
Estas teorías resultan coherentes en base a los resultados observados en el presente estudio, especialmente teniendo en cuenta que tanto la goma guar, y sus respectivos derivados hidrolizados (Pasquier et al., 1996), como la MD (Kishimoto et al., 2009) no interfieren en la actividad de enzimas digestivas como la lipasa pancreática. Además, cabe destacar que la posible fermentación de estas fibras a nivel intestinal podría contribuir a reducir los niveles de colesterol, tal y como se ha discutido con anterioridad (**Véase página 201**). Este tipo de mecanismos resultan de gran interés para la industria alimentaria ya que al ser independientes de la viscosidad permiten incorporar este tipo de fibras en alimentos sin alterar significativamente sus propiedades organolépticas.

Por lo que respecta al quitosano se han propuesto diferentes mecanismos responsables de su efecto hipolipidémico. Estos mecanismos están principalmente relacionados con parámetros como el grado de desacetilación y el peso molecular (Aranaz et al., 2009). A diferencia de las fibras solubles estudiadas y otros polisacáridos, el quitosano es un polímero con propiedades catiónicas únicas debido a la presencia de grupos amino libres. Cuanto mayor es el grado de desacetilación, mayor es el número de grupos amino libre y mayor es la carga positiva en disolución (Tan et al., 1998). Existe un considerable consenso respecto a que cuanto mayor es el grado de desacetilación, mayor es la capacidad hipolipidémica del polímero de quitosano, lo que indicaría que puede interactuar con los lípidos mediante fuerzas electrostáticas (Deuchi et al., 1995a; Liu et al., 2008). Por ejemplo, los grupos amino del quitosano quedarían cargados positivamente debido al pH ácido del estómago ($-\text{NH}_3^+$), lo que favorecería la atracción entre los grupos carboxilo de lípidos como los ácidos grasos y los ácidos biliares ($-\text{COO}^-$) (Parra-Barraza et al., 2005;

Wydro et al., 2007). Éste mecanismo explicaría el efecto *fat-binding* selectivo observado *in vivo* en el presente estudio. Es bien conocido que cuanto menor es la longitud de la cadena de los AG mayor es su polaridad, hecho que explicaría la mayor afinidad del quitosano de unirse a AGS con cadenas más cortas y la pérdida de eficacia al aumentar la longitud de cadena. A su vez, también se explicaría la elevada eficacia a la hora de aumentar la excreción de AGI, ya que el grado de insaturación correlaciona positivamente con el grado de polaridad de los AG. No obstante, en base a esta teoría y al contrario de los resultados obtenidos cabría esperar que el quitosano presentase un mayor efecto sobre el ALA en comparación al LA. Una posible explicación a dicha discrepancia podría basarse en la elevada concentración de LA comparado con ALA en las dietas, ya que por un simple mecanismo de competencia la interacción del quitosano con el LA podría verse favorecida. También es posible que la conformación de los AG pueda influir en el efecto del quitosano. El mayor número de insaturaciones del ALA hace que presente una conformación más curvada lo que podría disminuir la interacción con el quitosano (**Figura 5-14**). De hecho, hay que tener en cuenta que en base a modelos *in vitro* algunos autores han propuesto que también podrían tener lugar otro tipo de interacciones no covalentes como, por ejemplo, interacciones hidrofóbicas entre la cola de los AG y el quitosano (Muzzarelli et al., 2006; Wydro et al., 2007). Este tipo de interacciones podrían contribuir al efecto global del quitosano sobre la excreción de AG y otros lípidos. No obstante, con la finalidad de esclarecer estas hipótesis resultaría conveniente realizar estudios adicionales incluyendo dietas con diferente composición en AG.

Por lo que respecta a la excreción de colesterol, los grupos NH_3^+ del quitosano podrían reaccionar con los grupos hidroxilo (-OH) del colesterol (Parra-Barraza et al., 2005), pese a que es posible que la interacción entre el quitosano y el colesterol también tenga lugar a través de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de ambas moléculas (Wydro et al., 2007).

Figura 5-14: Mecanismo de interacción entre el quitosano y ácidos grasos



El principal mecanismo del quitosano podría deberse a la interacción entre sus grupos amino y los grupos carboxilo de los ácidos grasos y biliarés.

Por otra parte, se piensa que el peso molecular del quitosano podría tener también un papel importante en la excreción de lípidos, ya que al igual que otros polímeros, correlaciona con un aumento de la viscosidad *in vitro* (Bangoura et al., 2009; Knaul et al., 1998b). El quitosano es soluble en un medio ácido y gelifica cuando su peso molecular es alto, lo que podría atrapar los lípidos en el estómago y dificultar su posterior absorción en el intestino. No obstante, existen grandes discrepancias a este respecto, debido a que aunque en algunos estudios se ha visto que un mayor peso molecular y viscosidad puede aumentar el efecto hipolipidémico del quitosano (Beysseriat et al., 2006; Deuchi et al., 1995a), en otros se ha observado que polímeros de diferente peso molecular y viscosidad presentan el mismo efecto hipocolesterolémico (Ikeda et al., 1993; Sugano et al., 1988). Los resultados del presente trabajo, y especialmente los de la segunda fase experimental,

demuestran que la viscosidad no es un parámetro imprescindible para que el quitosano presente capacidad hipolipidémica, ya que el polímero de quitosano de menor peso molecular y viscosidad (LV) presentó capacidad de disminuir los niveles de lípidos en plasma, incluso a unos niveles similares al polímero de alta viscosidad (HV). No obstante, los resultados también demuestran que la viscosidad del quitosano puede tener repercusiones importantes, por ejemplo, potenciando su efecto sobre digestibilidad de la grasa y disminuyendo el consumo de pienso, y en consecuencia teniendo un mayor impacto sobre el peso del animal.

Por último, la elevada actividad hipolipidémica del quitosano ha hecho que se cuestione si también podría ser un inhibidor de enzimas claves en la digestión de la grasa de la dieta a nivel intestinal como la lipasa pancreática. Hasta la fecha los resultados son controvertidos, ya que aunque en modelos *in vitro* se ha observado que el quitosano puede reducir la hidrólisis de triglicéridos mediada por lipasa (Sumiyoshi & Kimura, 2006; Tsujita et al., 2007), dicho efecto no ha podido ser confirmado en estudios *in vivo* (Asha & Nair, 2005).

En conclusión, a pesar de que la capacidad hipolipidémica del quitosano puede depender de diferentes factores, su principal mecanismo de acción es atribuible a un fenómeno de adsorción. Por lo tanto, gracias a sus propiedades catiónicas el quitosano presenta un mecanismo de acción que puede ser de gran interés para la industria alimentaria, biomédica y farmacéutica, así como para otros ámbitos tecnológicos. Por ejemplo, corrobora la potencial utilidad de producir quitooligosacáridos, oligómeros de bajo peso molecular obtenidos a partir de la hidrólisis del quitosano, que presenten propiedades fisicoquímicas adaptadas a un determinado uso de interés pero que mantengan propiedades bioactivas.

Finalmente, el presente estudio revela la importancia de tener en cuenta la composición de la dieta a la hora de estudiar el efecto hipolipidémico, tanto del quitosano como de otras fibras con posible efecto selectivo, ya que el perfil lipídico de la dieta podría influir de manera significativa en su efectividad y repercusión sobre la salud.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados de la presente Tesis Doctoral se obtienen las siguientes conclusiones:

- Entre las fibras estudiadas, el consumo de las fibras PHGG y quitosano puede reducir la ganancia de peso en animales alimentados con dietas ricas en grasa.
 - La PHGG es capaz de reducir la ganancia de peso sin alterar el consumo de pienso y sin que una reducción de su viscosidad, dentro de los niveles estudiados, suponga una pérdida de este efecto.
 - El quitosano es capaz de reducir la ganancia de peso cuando es consumido junto con dietas ricas en grasa e hipercolesterolémicas. Cuando el quitosano presenta una elevada viscosidad disminuye el consumo de pienso, lo que contribuye a un mayor efecto sobre la ganancia de peso del animal.

- Todas las fibras estudiadas presentan la capacidad de aumentar la excreción de lípidos, aunque presentan mecanismos diferentes.
 - El consumo de PHGG, independientemente de su viscosidad, y MD incrementa la excreción esteroides neutros, especialmente en forma de metabolitos secundarios del colesterol como el coprostanol, pero no de ácidos biliares.
 - El consumo de quitosano, independientemente de su viscosidad, incrementa la excreción de esteroides neutros y ácidos biliares, pero reduce la bioconversión de colesterol y ácidos biliares primarios a sus respectivos metabolitos secundarios.

- Aunque todas las fibras estudiadas incrementan la excreción de AG sólo el quitosano presenta capacidad *fat-binding* selectiva.
 - El quitosano presenta una menor afinidad por los AGS cuanto mayor es la longitud de cadena del AGS.
 - El quitosano presenta una gran capacidad de unión a AGI, lo que disminuye la relación de AGS/AGI de las heces.
 - El quitosano es más eficiente incrementando la excreción de AGPI n-6 que n-3 cuando es consumido junto con dietas con una elevada relación de AGPI n-6/n-3.

- Una mayor viscosidad del quitosano supone una mayor excreción de AG, pero su capacidad *fat-binding* selectiva no se ve afectada.
- Todas las fibras estudiadas presentan efectos hipocolesterolémicos, ya que reducen los niveles de colesterol tanto en plasma como en hígado.
 - Tanto en el caso de la PHGG como del quitosano este efecto resulta independiente de su viscosidad.
 - El quitosano presenta además la capacidad de evitar un incremento de los niveles de colesterol causado por dietas hipercolesterolémicas.
- La capacidad *fat-binding* selectiva del quitosano puede alterar el perfil de AG de plasma e hígado, ya que puede alterar la relación de AGPI n-6/n-3.

7. BIBLIOGRAFÍA

-A-

- Abbey, M., Belling, G. B., Noakes, M., Hirata, F., & Nestel, P. J. (1993). Oxidation of low-density lipoproteins: Intraindividual variability and the effect of dietary linoleate supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(3), 391-398.
- Abbott, S. K., Else, P. L., Atkins, T. A., & Hulbert, A. J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(5), 1309-1317.
- Achour, L., Nancey, S., Moussata, D., Graber, I., Messing, B., & Flourié, B. (2007). Faecal bacterial mass and energetic losses in healthy humans and patients with a short bowel syndrome. *European journal of clinical nutrition*, 61(2), 233-238.
- Adkins, Y., & Kelley, D. S. (2010). Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(9), 781-792.
- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 44, 483.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2013). Evaluación nutricional de la Dieta Española: I. Energía y Macronutrientes.
http://www.aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/valoracion_nutricional_enide_macronutrientes.pdf. Última consulta: 27/03/2013
- Ajslev, T. A., Andersen, C. S., Gamborg, M., Sørensen, T. I. A., & Jess, T. (2011). Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: The role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *International Journal of Obesity*, 35(4), 522-529.
- Akasaka, K., & Ohrui, H. (2000). Development of phosphine reagents for the high-performance liquid chromatographic-fluorometric determination of lipid hydroperoxides. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 159-170.

- Akasaka, K., Ohata, A., Ohrui, H., & Meguro, H. (1995). Automatic-determination of hydroperoxides of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in human plasma. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 665(1), 37-43.
- Al-Lahham, S. H., Peppelenbosch, M. P., Roelofsen, H., Vonk, R. J., & Venema, K. (2010). Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(11), 1175-1183.
- Alexandre, A., & Miguel, M. (2008). Dietary fiber in the prevention and treatment of metabolic syndrome: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(10), 905-912.
- Alminger, M., & Eklund-Jonsson, C. (2008). Whole-grain cereal products based on a high-fibre barley or oat genotype lower post-prandial glucose and insulin responses in healthy humans. *European Journal of Nutrition*, 47(6), 294-300.
- Alvaro, A., Rosales, R., Masana, L., & Vallvé, J. -. (2010). Polyunsaturated fatty acids down-regulate in vitro expression of the key intestinal cholesterol absorption protein NPC1L1: No effect of monounsaturated nor saturated fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(6), 518-525.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum-cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(4), 470.
- American Heart Association (2013). What Your Cholesterol Levels Mean. http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/AboutCholesterol/What-Your-Cholesterol-Levels-Mean_UCM_305562_Article.jsp. Última consulta: 27/01/2013
- Andersen, L. F., Solvoll, K., & Drevon, C. A. (1996). Very-long-chain n-3 fatty acids as biomarkers for intake of fish and n- 3 fatty acid concentrates. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), 305-311.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr., R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, 67(4), 188-205.

- Anderson, J. W., Jones, A. E., & Riddellmason, S. (1994). 10 Different Dietary-Fibers have significantly Different Effects on Serum and Liver Lipids of Cholesterol-Fed Rats. *Journal of Nutrition*, 124(1), 78-83.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., & Heras, Á (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.
- Aranceta, J., & Serra Majem, L. (2011). Grupo Colaborativo para la actualización de los Objetivos Nutricionales para la Población Española. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*(17), 179-199.
- Aranceta, J., & Pérez-Rodrigo, C. (2012). Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: A systematic review. *British Journal of Nutrition*, 107(SUPPL. 2), S8-S22.
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1467S-1476S.
- Ascherio, A. (2006). Trans fatty acids and blood lipids. *Atherosclerosis Supplements*, 7(2), 25-27.
- Asha, K. K., & Nair, P. G. V. (2005). Effect of chitin-chitosan treatment on fatty liver in rats with a high fat diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 37(3), 87-94.
- Association of Official Analytical Chemists (1993). AOAC Peer Verified Methods Policies and Procedures.

-B-

- Baer, D. J., Judd, J. T., Kris-Etherton, P. M., & Zhao, G. (2003). Stearic acid absorption and its metabolizable energy value are minimally lower than those of other fatty acids in healthy men fed mixed diets. *Journal of Nutrition*, 133(12), 4129.
- Bangoura, M., Wenshui, X., & Jiali, Z. (2009). In vitro binding capacity of cholesterol and bile salts by partially depolymerized chitosans. *American Journal of Food Technology*, 4(3), 126-135.

- Barona, J., & Fernandez, M. L. (2012). Dietary cholesterol affects plasma lipid levels, the intravascular processing of lipoproteins and reverse cholesterol transport without increasing the risk for heart disease. *Nutrients*, 4(8), 1015-1025.
- Bautista, L. E. (2012). Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction. *The Lancet*, 380(9858), 1990-1991.
- Bays, H. E., Tighe, A. P., Sadovsky, R., & Davidson, M. H. (2008). Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6(3), 391.
- Berdanier, C. (2007). Fatty Acids and Membrane Function. In C. K. Chow, *Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Third Edition* (pp. 693-712). CRC Press.
- Bermejo, P., Martín-Aragón, S., Benedí, J., Susín, C., Felici, E., Gil, P., Ribera, J. M., & Villar, A. M. (2008). Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Immunology letters*, 117(2), 198-202.
- Beysseriat, M., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 800-809.
- Biggerstaff, K. D., & Wooten, J. S. (2004). Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 28(3), 105-106.
- Blijdenstein, T. (2003). Microstructure, rheology and demixing in emulsions flocculated by polysaccharides. Tesis Doctoral, Wageningen, Centre for Food Sciences (WCFS). Wageningen, Holanda.
- Boucher, P., De Lorgeril, M., Salen, P., Crozier, P., Delaye, J., Vallon, J. -, Geysant, A., & Dante, R. (1998). Effect of dietary cholesterol on low density lipoprotein-receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and low density lipoprotein receptor-related protein mRNA expression in healthy humans. *Lipids*, 33(12), 1177-1186.
- Brennan, C. S. (2005). Dietary fibre, glycaemic response, and diabetes (vol 49, pg 560 2005). *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(7), 716-716.

- Brown, J. M., & Yu, L. (2009). Opposing gatekeepers of apical sterol transport: Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) and ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). *Immunology, Endocrine and Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 9(1), 18-30.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., & Sacks, F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: A meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 30-42.
- Bruckner, G. (2007). Fatty Acids and Cardiovascular Disease. In C. Kuang, *Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Third Edition* (pp. 1061-1084). CRC Press.
- Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2006). A high-saturated fat diet enriched with phytosterol and pectin affects the fatty acid profile in guinea pigs. *Lipids*, 41(2), 159.
- Buil-Cosiales, P., Irimia, P., Ros, E., Riverol, M., Gilabert, R., Martínez-Vila, E., Núñez, I., Díez-Espino, J., Martínez-González, M. A., & Serrano-Martínez, M. (2009). Dietary fibre intake is inversely associated with carotid intima-media thickness: A cross-sectional assessment in the PREDIMED study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(10), 1213-1219.
- Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Blasco-Baque, V., & Amar, J. (2011). Gut microbiota and diabetes: From pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetologica*, 48(4), 257-273.
- Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2005a). Alpha-linolenic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 426-439.
- Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2005b). Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reproduction Nutrition Development*, 45(5), 581-597.
- Burkitt, D. P., & Trowell, H. C. (1977). Dietary fibre and western diseases. *Irish Medical Journal*, 70(9), 272-277.
- Burnett, J. R., Barrett, P. H. R., & Rader, D. J. (2002). Apolipoprotein B metabolism: Tracer kinetics, models, and metabolic studies. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 39(2), 89-137.

Butt, M. S., Shahzadi, N., Sharif, M. K., & Nasir, M. (2007). Guar gum: A miracle therapy for hypercholesterolemia, hyperglycemia and obesity. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 47(4), 389.

-C-

Calder, P. C., & Deckelbaum, R. J. (2011). Harmful, harmless or helpful? the n-6 fatty acid debate goes on. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(2), 113-114.

Calder, P. C. (2006). n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1505S-1519S.

Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M., & Keller, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(2), 93-104.

Clamp, A. G., Ladha, S., Clark, D. C., Grimble, R. F., & Lund, E. K. (1997). The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids*, 32(2), 179-184.

Clifton, P. M., Kestin, M., Abbey, M., Drysdale, M., & Nestel, P. J. (1990). Relationship between sensitivity to dietary fat and dietary cholesterol. *Arteriosclerosis*, 10(3), 394-401.

Covas, M. -, Konstantinidou, V., & Fitó, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 477-482.

Cummings, J. (2001). The Effect of Dietary Fiber on Fecal Weight and Composition. In G. A. Spiller, *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition, Third Edition* (pp. 183-252). CRC Press.

Chawla, R., & Patil, G. R. (2010). Soluble dietary fiber. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 178-196.

Chen, H. -, Haack, V. S., Janecky, C. W., Vollendorf, N. W., & Marlett, J. A. (1998). Mechanisms by which wheat bran and oat bran increase stool weight in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(3), 711-719.

- Chen, J., Li, Q., Zhang, Y., Yang, P., Zong, Y., Qu, S., & Liu, Z. (2011). Oleic acid decreases the expression of a cholesterol transport-related protein (NPC1L1) by the induction of endoplasmic reticulum stress in CaCo-2 cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67(2), 153-163.
- Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: Regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955-1966.
- Chiang, M. -, Yao, H. -, & Chen, H. -. (2000). Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(5), 965-971.
- Chilton, F. H., Rudel, L. L., Parks, S. P., Arm, J. P., & Seeds, M. C. (2008). Mechanisms by which botanical lipids affect inflammatory disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 498S.
- Chirala, S. S., & Wakil, S. J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*, 39(11), 1045-1053.
- Choi, C. -, Kim, E. -, Kim, Y. -, Je, J. -, An, S. -, Lee, J. D., Wang, J. H., Ki, S. S., Jeon, B. -, Moon, S. -, & Park, P. -. (2012). Chitooligosaccharides decreases plasma lipid levels in healthy men. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(1), 103-106.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *The Lancet*, 366(9493), 1267-1278.
- Chung, M. J., Park, J. K., & Park, Y. I. (2012). Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *International Immunopharmacology*, 12(2), 453-459.
- Chutkan, R., Fahey, G., Wright, W. L., & Mcorrie, J. (2012). Viscous versus nonviscous soluble fiber supplements: Mechanisms and evidence for fiber-specific health benefits. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 24(8), 476-487.

-D-

- Das, U. N. (2006). Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal*, 1(4), 420-439.
- Davidson, M. H. (2011). Therapies targeting exogenous cholesterol uptake: New insights and controversies. *Current atherosclerosis reports*, 13(1), 95-100.
- Davis Jr., H. R., & Altmann, S. W. (2009). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 679-683.
- Davis, P., & Waggener, J. (2005). Lipid and Lipoprotein Metabolism. In B. Stamford, & R. Moffat, (pp. 47-60). *Lipid Metabolism and Health*. CRC Press.
- Denke, M. A., & Grundy, S. M. (1991). Effects of fats high in stearic acid on lipid and lipoprotein concentrations in men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6), 1036-1040.
- Deuchi, K., Kanauchi, O., Imasato, Y., & Kobayashi, E. (1995a). Effect of the viscosity or deacetylation degree of chitosan on fecal fat excreted from rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(5), 781-785.
- Deuchi, K., Kanauchi, O., Shizukuishi, M., & Kobayashi, E. (1995b). Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(7), 1211-1216.
- Devries, J. W., Prosky, L., Li, B., & Cho, S. (1999). A Historical Perspective on Defining Dietary Fiber. *Cereal Foods World*, 44(5), 367-369.
- Díaz, J., Argüeso, R., Vega, P., Garrido, J. A., Gordo, E., Fraile, E., & Fernández, O. (2011). Ruta del transporte reverso. *Galicia Clínica*, 72(Supl. 1), S35-S41.
- Dietschy, J. M. (1997). Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(5 SUPPL.), 1581S-1589S.
- Draper, H. H., Squires, E. J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., & Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(4), 353-363.

-E-

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4663), reduction of intestinal transit time (ID 4664) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(6), 2214.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *The EFSA Journal* 8, 1461.

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411-421.

Ellis, P. R., Dawoud, F. M., & Morris, E. R. (1991). Blood glucose, plasma insulin and sensory responses to guar-containing wheat breads: Effects of molecular weight and particle size of guar gum. *British Journal of Nutrition*, 66(3), 363-379.

Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1987). Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45(2), 423-431.

Erkkila, A., de Mello, V. D. F., Riserus, U., & Laaksonen, D. E. (2008). Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Progress in lipid research*, 47(3), 172-187.

Eurostat (2010). Eurostat: Causes of Death.

<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>. Última consulta: 2013/16/2013

-F-

Fastinger, N. D., Karr-Lilienthal, L. K., Spears, J. K., Swanson, K. S., Zinn, K. E., Nava, G. M., Ohkuma, K., Kanahori, S., Gordon, D. T., & Fahey Jr., G. C. (2008). A novel resistant

- maltodextrin alters gastrointestinal tolerance factors, fecal characteristics, and fecal microbiota in healthy adult humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), 356-366.
- Fava, F., Lovegrove, J. A., Gitau, R., Jackson, K. G., & Tuohy, K. M. (2006). The gut microbiota and lipid metabolism: Implications for human health and coronary heart disease. *Current medicinal chemistry*, 13(25), 3005-3021.
- Favier, M. -, Bost, P. -, Guittard, C., Demigné, C., & Rémésy, C. (1997). The cholesterol-lowering effect of guar gum is not the result of a simple diversion of bile acids toward fecal excretion. *Lipids*, 32(9), 953-959.
- Fernandez, M. L., & West, K. L. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *Journal of Nutrition*, 135(9), 2075.
- Fernandez, M. L., West, K. L., Roy, S., & Ramjiganesh, T. (2001). Dietary fat saturation and gender/hormonal status modulate plasma lipids and lipoprotein composition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(12), 703.
- Fernandez, M. L., & Volek, J. S. (2006). Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutrition & Metabolism*, 3(17).
- Fernandez, M. L., Wilson, T. A., Conde, K., Vergara-Jimenez, M., & Nicolosi, R. J. (1999). Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. *Journal of Nutrition*, 129(7), 1323-1332.
- Fernandez, M. L., Lin, E. C. K., & McNamara, D. J. (1992). Differential effects of saturated fatty acids on low density lipoprotein metabolism in the guinea pig. *Journal of lipid research*, 33(12), 1833-1842.
- Finucane, M. M., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Danaei, G., Lin, J. K., Paciorek, C. J., Singh, G. M., Gutierrez, H. R., Lu, Y., Bahalim, A. N., Farzadfar, F., Riley, L. M., & Ezzati, M. (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *The Lancet*, 377(9765), 557-567.

- Flickinger, E. A., Wolf, B. W., Garleb, K. A., Chow, J., Leyer, G. J., Johns, P. W., & Fahey Jr., G. C. (2000). Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. *Journal of Nutrition*, 130(5), 1267-1273.
- Food and Nutrition Board. (2005). *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids (macronutrients)*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Frayn, K. N. (1998). *Regulación del metabolismo: una perspectiva humana*. Ed. Omega.
- Friedman, M. I. (1995). Control of energy intake by energy metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62(5 SUPPL.), 1096S-1100S.
- Fritsche, K. L. (2008). Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it? *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3-5), 173-175.
- Frohlich, J., & Al-Sarraf, A. (2013). Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention. *Cardiovascular Pathology*, 22(1), 16-18.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M. J., Sánchez-Zapata, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*, 43(4), 931-942.
- Fukada, Y., Kimura, K., & Ayaki, Y. (1991). Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipids*, 26(5), 395-399.
- Fukumitsu, S., Villareal, M. O., Onaga, S., Aida, K., Han, J., & Isoda, H. (2012). α -Linolenic acid suppresses cholesterol and triacylglycerol biosynthesis pathway by suppressing SREBP-2, SREBP-1a and -1c expression. *Cytotechnology*, 1-9.

-G-

- Gades, M. D., & Stern, J. S. (2005). Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(1), 72.
- Gades, M. D., & Stern, J. S. (2002). Chitosan supplementation does not affect fat absorption in healthy males fed a high-fat diet, a pilot study. *International Journal of Obesity*, 26(1), 119.

- Gaesser, G. A. (2007). Carbohydrate quantity and quality in relation to body mass index. *Journal of the American Dietetic Association*, 107, 1768.
- Galkina, E., & Ley, K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual Review of Immunology*, 27, 165-197.
- Gallaher, C. M., Munion, J., Hesslink, R., Wise, J., & Gallaher, D. D. (2000). Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *Journal of Nutrition*, 130(11), 2753.
- Gallaher, D. D., Gallaher, C. M., Mahrt, G. J., Carr, T. C., Hollingshead, C. H., Hesslink, R., & Wise, J. (2002). A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(5), 428.
- Gallaher, D. D., Hassel, C. A., & Lee, K. -. (1993). Relationships between viscosity of hydroxypropyl methylcellulose and plasma cholesterol in hamsters. *Journal of Nutrition*, 123(10), 1732-1738.
- Gallaher, D. D., Hassel, C. A., Lee, K. -. , & Gallaher, C. M. (1993). Viscosity and fermentability as attributes of dietary fiber responsible for the hypocholesterolemic effect in hamsters. *Journal of Nutrition*, 123(2), 244-252.
- Gallo-Torres, H. E., Ludorf, J., & Brin, M. (1978). The effect of medium-chain triglycerides on the bioavailability of vitamin E. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 48(3), 240-249.
- Ganguly, R., & Pierce, G. N. (2012). Trans fat involvement in cardiovascular disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(7), 1090-1096.
- Gay, C. A., & Gebicki, J. M. (2003). Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xyleneol orange method. *Analytical Biochemistry*, 315(1), 29-35.
- Gebicki, J. M. (1997). Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species. *Redox Report*, 3(2), 99-110.
- Giannini, E. G., Mansi, C., Dulbecco, P., & Savarino, V. (2006). Role of partially hydrolyzed guar gum in the treatment of irritable bowel syndrome. *Nutrition*, 22(3), 334-342.

Gordon, S. M., Hofmann, S., Askew, D. S., & Davidson, W. S. (2011). High density lipoprotein: It's not just about lipid transport anymore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(1), 9-15.

Grove, D., & Pownall, H. J. (1991). Comparative specificity of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase from ten animal species. *Lipids*, 26(6), 416-420.

Gunness, P., & Gidley, M. J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food and Function*, 1(2), 149-155.

-H-

Haa, Y. C., & Barter, P. J. (1982). Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 71(2), 265-269.

Hara, H., Haga, S., Aoyama, Y., & Kiriya, S. (1999). Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *Journal of Nutrition*, 129(5), 942-948.

Harman, N. L., Leeds, A. R., & Griffin, B. A. (2008). Increased dietary cholesterol does not increase plasma low density lipoprotein when accompanied by an energy-restricted diet and weight loss. *European Journal of Nutrition*, 47(6), 287-293.

Harris, W. S., Mozaffarian, D., Rimm, E., Kris-Etherton, P., Rudel, L. L., Appel, L. J., Engler, M. M., Engler, M. B., & Sacks, F. (2009). Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: A science advisory from the American Heart Association nutrition subcommittee of the council on nutrition, physical activity, and metabolism; council on cardiovascular nursing; and council on epidemiology and prevention. *Circulation*, 119(6), 902-907.

Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A. P., Davidson, M. H., & Schaefer, E. J. (2008). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*, 197(1), 12-24.

Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. -, Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*, 71(2-3), 235-244.

- Hipsley, E. H. (1953). Dietary "fibre" and pregnancy toxemia. *British Medical Journal*, 2(4833), 420.
- Hodson, L., Skeaff, C. M., & Fielding, B. A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in lipid research*, 47(5), 348-380.
- Holman, R. T. (1988). George O. Burr and the discovery of essential fatty acids. *Journal of Nutrition*, 118(5), 535-540.
- Holley, A. E., & Slater, T. F. (1991). Measurement of lipid hydroperoxides in normal human blood plasma using HPLC-chemiluminescence linked to a diode array detector for measuring conjugated dienes. *Free radical research communications*, 15(1), 51-63.
- Hossain, S., Rahman, A., Kabir, Y., Shams, A. A., Afros, F., & Hashimoto, M. (2007). Effects of shrimp (*Macrobracium rosenbergii*)-derived chitosan on plasma lipid profile and liver lipid peroxide levels in normo- and hypercholesterolaemic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(3), 170-176.
- Howarth, N. C., Saltzman, E., & Roberts, S. B. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutrition reviews*, 59(5), 129-139.
- Hu, F. B., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Manson, J. E., Ascherio, A., Colditz, G. A., Rosner, B. A., Spiegelman, D., Speizer, F. E., Sacks, F. M., Hennekens, C. H., & Willett, W. C. (1999). A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *Journal of the American Medical Association*, 281(15), 1387-1394.
- |-
- Ide, T., Moriuchi, H., & Nihimoto, K. (1991). Hypolipidemic effects of guar gum and its enzyme hydrolysate in rats fed highly saturated fat diets. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 35(1), 34-44.
- Iggman, D., & Risérus, U. (2011). Role of different dietary saturated fatty acids for cardiometabolic risk. *Clinical Lipidology*, 6(2), 209-223.

Ikedo, I., Sugano, M., Yoshida, K., Sasaki, E., Iwamoto, Y., & Hatano, K. (1993). Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3), 431.

Imaizumi, K., Abe, K., Kuroiwa, C., & Sugano, M. (1993). Fat containing stearic acid increases fecal neutral steroid excretion and catabolism of low density lipoproteins without affecting plasma cholesterol concentration in hamsters fed a cholesterol-containing diet. *Journal of Nutrition*, 123(10), 1693-1702.

-J-

Jalili, T., Wildman, R., & Medeiros, D. (2000). Dietary Fiber and Coronary Heart Disease. In R. E. C. Wildman, *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press.

James, W. P. T. (2008). WHO recognition of the global obesity epidemic. *International Journal of Obesity*, 32(SUPPL. 7), S120-S126.

Jenkins, (2004). Viscous dietary fibre and metabolic effects. *Clinical Nutrition*, 39.

Jessup, W., Dean, R. T., & Gebicki, J. M. (1994). Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Methods in enzymology*, 233, 289-303.

Jia, L., Betters, J. L., & Yu, L. (2011). Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annual Review of Physiology*, 73, 239-259.

Jones, A. E., Stolinski, M., Smith, R. D., Murphy, J. L., & Wootton, S. A. (1999). Effect of fatty acid chain length and saturation on the gastrointestinal handling and metabolic disposal of dietary fatty acids in women. *British Journal of Nutrition*, 81(1), 37-43.

Jull, A. B., Ni Mhurchu, C., Bennett, D. A., Dunshea-Mooij, C. A. E., & Rodgers, A. (2008). Chitosan for overweight or obesity. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(3).

-K-

Kapoor, M., & Juneja, L. (2009). Partially Hydrolyzed Guar Gum Dietary Fiber. In *Anonymous Fiber Ingredients*. CRC Press.

Keithley, J., & Swanson, B. (2005). Glucomannan and obesity: A critical review. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 11(6), 30.

- Keller, S., & Jahreis, G. (2004). Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography–mass spectrometry–single ion monitoring in faeces. *Journal of Chromatography B*, 813(1-2), 199-207.
- Keys, A., Grande, F., & Anderson, J. T. (1961). Fiber and Pectin in the Diet and Serum Cholesterol Concentration in Man. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 106(3), 555-558.
- Kishimoto, Y., Yoshikawa, Y., Miyazato, S., Oga, H., Yamada, T., Tagami, H., Hashizume, C., & Kunio, Y. (2009). Effect of resistant maltodextrin on digestion and absorption of lipids. *Journal of Health Science*, 55(5), 838-844.
- Kishimoto, Y., Wakabayashi, S., & Takeda, H. (1995). Hypocholesterolemic effect of dietary fiber: relation to intestinal fermentation and bile acid excretion. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 41(1), 151-161.
- Knaul, J. Z., Bui, V. T., Creber, K. A. M., & Kasaai, M. R. (1998). Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*, 76(11), 1699-1706.
- Koide, S. S. (1998). Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, 18(6), 1091.
- Kokubo, Y., Iso, H., Saito, I., Yamagishi, K., Ishihara, J., Inoue, M., & Tsugane, S. (2011). Dietary fiber intake and risk of cardiovascular disease in the Japanese population: the Japan Public Health Center-based study cohort. *European Journal of Clinical Nutrition*.
- Kurushima, H., Hayashi, K., Toyota, Y., Kambeb, M., & Kajiyama, G. (1995). Comparison of hypocholesterolemic effects induced by dietary alpha-linoleic acid and oleic acid in hamsters. *Atherosclerosis*, 114(2), 213.

-L-

- Lakshmanan, M. R., Nepokroeff, C. M., Ness, G. C., Dugan, R. E., & Porter, J. W. (1973). Stimulation by insulin of rat liver β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase

- and cholesterol-synthesizing activities. *Biochemical and biophysical research communications*, 50(3), 704-710.
- Lapointe, A., Couillard, C., & Lemieux, S. (2006). Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(10), 645-658.
- Lee, J. -, & Carr, T. P. (2004). Dietary fatty acids regulate Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and cytosolic cholesteryl ester hydrolase in hamsters. *Journal of Nutrition*, 134(12), 3239-3244.
- Lee, S. D., Gershkovich, P., Darlington, J. W., & Wasan, K. M. (2012). Inhibition of cholesterol absorption: Targeting the intestine. *Pharmaceutical Research*, 29(12), 3235-3250.
- Liao, F. -, Shieh, M. -, Chang, N. -, & Chien, Y. -. (2007). Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. *Nutrition Research*, 27(3), 146-151.
- Lichtenstein, A. H. (1990). Intestinal cholesterol metabolism. *Annals of Medicine*, 22(1), 49-52.
- Lim, C. C., Ferguson, L. R., & Tannock, G. W. (2005). Dietary fibres as "prebiotics": Implications for colorectal cancer. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(6), 609-619.
- Linetzky Waitzberg, D., Alves Pereira, C. C., Logullo, L., Manzoni Jacintho, T., Almeida, D., Teixeira da Silva, M. L., & Matos de Miranda Torrinhas, R. S. (2012). Microbiota benefits after inulin and partially hydrolyzed guar gum supplementation: a randomized clinical trial in constipated women. *Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 27(1), 123-129.
- Liu, J., Zhang, J., & Xia, W. (2008). Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 107(1), 419.
- Livesey, G. (2000). The absorption of stearic acid from triacylglycerols: an inquiry and analysis. *Nutrition Research Reviews*, 13(2), 185.

- López-López, A., Castellote-Bargalló, A. I., & López-Sabater, M. C. (2000). Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in infant feces. *Analytical Biochemistry*, 282(2), 250.
- Lopez, S., Bermudez, B., Varelal, L. M., Ortega, A., Jaramillo, S., Abial, R., & Muriana, F. J. G. (2012). Olives and olive oil: Diet and health impacts. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7.
- Louheranta, A. M., Porkkala-Sarataho, E. K., Nyysönen, M. K., Salonen, R. M., & Salonen, J. T. (1996). Linoleic acid intake and susceptibility of very-low-density and low-density lipoproteins to oxidation in men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5), 698-703.
- Ludwig, D. S., Pereira, M. A., Kroenke, C. H., Hilner, J. E., Van Horn, L., Slattery, M. L., & Jacobs Jr., D. R. (1999a). Dietary fiber, weight gain, and cardiovascular disease risk factors in young adults. *JAMA*, 282(16), 1539.
- Ludwig, D. S., Majzoub, J. A., Al-Zahrani, A., Dallal, G. E., Blanco, I., & Roberts, S. B. (1999b). High glycemic index foods, overeating, and obesity. *Pediatrics*, 103(3).
- Luoto, R., Kalliomäki, M., Laitinen, K., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Salminen, S., & Isolauri, E. (2011). Initial dietary and microbiological environments deviate in normal-weight compared to overweight children at 10 years of age. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 52(1), 90-95.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D., & Wylie-Rosett, J. (2010). Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2010 update: A report from the american heart association. *Circulation*, 121(7), e46-e215.

-M-

- MacKay, D., & Jones, P. J. H. (2011). Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis*, 218(2), 253-262.
- Malik, V. S., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2013). Global obesity: Trends, risk factors and policy implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(1), 13-27.
- Mangiacapra, F., De Bruyne, B., Peace, A. J., Melikian, N., Wijns, W., & Barbato, E. (2012). High cholesterol levels are associated with coronary microvascular dysfunction. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 13(7), 439-442.
- Mann, J. (2001). Dietary fibre and diabetes revisited. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(11), 919.
- Marlett, J. (2001). Dietary Fiber and Cardiovascular Disease. In M. L. Dreher, & S. S. Cho, *Handbook of Dietary Fiber*. CRC Press.
- McCleary, B. V., & Prosky, L. (2001). *Advanced dietary fibre technology*. Ed. Blackwell Science.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1146-1155.
- Minekus, M., Jelier, M., Xiao, J. Z., Kondo, S., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Bos, M., Dunnewind, B., & Havenaar, R. (2005). Effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on the bioaccessibility of fat and cholesterol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(5), 932.
- Misra, A., & Khurana, L. (2008). Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11 SUPPL. 1), s9-s30.
- Moriceau, S., Besson, C., Levrat, M. -, Moundras, C., Rémésy, C., Morand, C., & Demigné, C. (2000). Cholesterol-lowering effects of guar gum: Changes in bile acid pools and intestinal reabsorption. *Lipids*, 35(4), 437-444.
- Murphy, E. A., Davis, J. M., & Carmichael, M. D. (2010). Immune modulating effects of β -glucan. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13(6), 656-661.

Muzzarelli, R. A. (1999). Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control. *EXS*, 87, 293-304.

Muzzarelli, R. A. A., Orlandini, F., Pacetti, D., Boselli, E., Frega, N. G., Tosi, G., & Muzzarelli, C. (2006). Chitosan taurocholate capacity to bind lipids and to undergo enzymatic hydrolysis: An in vitro model. *Carbohydrate Polymers*, 66(3), 363-371.

Muzzarelli, R., & Muzzarelli, C. (2006). Chitosan as a Dietary Supplement and a Food Technology Agent. In C. G. Biliaderis, & M. S. Izydorczyk, *Functional Food Carbohydrates* (pp. 215-247). CRC Press.

-N-

Nagata, J., & Saito, A. (2006). Effects of simultaneous intakes of indigestible dextrin and diacylglycerol on lipid profiles in rats fed cholesterol diets. *Nutrition*, 22(4), 395.

Nazih, H., Nazih-Sanderson, F., Krempf, M., Huvelin, J. M., Mercier, S., & Bard, J. M. (2001). Butyrate stimulates apoA-IV-containing lipoprotein secretion in differentiated Caco-2 cells: Role in cholesterol efflux. *Journal of Cellular Biochemistry*, 83(2), 230-238.

Ntambi, J. M. (1992). Dietary regulation of stearoyl-Coa desaturase-1 gene expression in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 267(15), 10925-10930.

-O-

OECD (2012). Obesity and the Economics of Prevention: Fit not Fat - Spain Key Facts. <http://www.oecd.org/health/health-systems/obesityandtheeconomicsofpreventionfitnotfat-spainkeyfacts.htm>. Última consulta: 23/2/2013

OECD (2011). Organization for Economic Co-Operation and Development. Statistics Data BaseHealth Status. http://stats.oecd.org/index.aspx?DataSetCode=HEALTH_STAT#. Última consulta: 23/3/2013

Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q., & Chen, C. (2005). Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 98(12), 845-856.

- Ohkuma, K., Hanno, Y., Inaba, K., Matsuda, I., & Katsuda, Y. (1997). Process for preparing dextrin containing food fiber. (US5620873).
- Okubo, T., Ishihara, N., Takahashi, H., Fujisawa, T., Kim, M., Yamamoto, T., & Mitsuoka, T. (1994). Effects of partially hydrolyzed guar gum intake on human intestinal microflora and its metabolism. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(8), 1364-1369.
- Okuzumi, A., Ueno, Y., Shimada, Y., Tanaka, Y., Miyamoto, N., Yamashiro, K., Tanaka, R., Hattori, N., & Urabe, T. (2013). Impact of low-density lipoprotein to high-density lipoprotein ratio on aortic arch atherosclerosis in unexplained stroke. *Journal of the neurological sciences*.
- Oliveira, H. C. F., & De Faria, E. C. (2011). Cholesteryl ester transfer protein: The controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB life*, 63(4), 248-257.
- Orton, H. D., Szabo, N. J., Clare-Salzler, M., & Norris, J. M. (2008). Comparison between omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid intakes as assessed by a food frequency questionnaire and erythrocyte membrane fatty acid composition in young children. *European journal of clinical nutrition*, 62(6), 733-738.
- Overton, P. D., Furlonger, N., Beety, J. M., Chakraborty, J., Tredger, J. A., & Morgan, L. M. (1994). The effects of dietary sugar-beet fiber and guar gum on lipid-metabolism in Wistar rats. *The British Journal of Nutrition*, 72(3), 385.

-P-

- Páramo, J. A., Orbe, J., & Rodríguez, J. A. (2003). Atheroma plaque stabilization: A new concept based on the dynamic biology of atherosclerosis. *Medicina clinica*, 121(15), 583-587.
- Parisi, G. C., Zilli, M., Miani, M. P., Carrara, M., Bottona, E., Verdianelli, G., Battaglia, G., Desideri, S., Faedo, A., Marzolino, C., Tonon, A., Ermani, M., & Leandro, G. (2002). High-fiber diet supplementation in patients with irritable bowel syndrome (IBS): A multicenter, randomized, open trial comparison between wheat bran diet and partially hydrolyzed guar gum (PHGG). *Digestive diseases and sciences*, 47(8), 1697-1704.

- Parra-Barraza, H., Burboa, M. G., Sánchez-Vázquez, M., Juárez, J., Goycoolea, F. M., & Valdez, M. A. (2005). Chitosan-cholesterol and chitosan-stearic acid interactions at the air-water interface. *Biomacromolecules*, 6(5), 2416-2426.
- Pasquier, B., Armand, M., Guillon, F., Castelain, C., Borel, P., Barry, J. -, Pieroni, G., & Lairon, D. (1996). Viscous soluble dietary fibers alter emulsification and lipolysis of triacylglycerols in duodenal medium in vitro. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(5), 293-302.
- Pawlak, D. B., Kushner, J. A., & Ludwig, D. S. (2004). Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homeostasis, and plasma lipids in animals. *Lancet*, 364(9436), 778-785.
- Pérez-Escamilla, R., Obbagy, J. E., Altman, J. M., Essery, E. V., McGrane, M. M., Wong, Y. P., Spahn, J. M., & Williams, C. L. (2012). Dietary Energy Density and Body Weight in Adults and Children: A Systematic Review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(5), 671-684.
- Perrotta, I. (2013). Ultrastructural features of human atherosclerosis. *Ultrastructural pathology*, 37(1), 43-51.
- Peter, R. E., Wang, Q., Rayment, P., Ren, Y., & Simon Ross-Murphy (2001). Guar Gum. In *Anonymous Handbook of Dietary Fiber*: CRC Press.
- Poppitt, S. D., Kilmartin, P., Butler, P., & Keogh, G. F. (2005). Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids in Health and Disease*, 4.
- Porter, J. L., Fordtran, J. S., Santa Ana, C. A., Emmet, M., Hagey, L. R., MacDonald, E. A., & Hofmann, A. F. (2003). Accurate enzymatic measurement of fecal bile acids in patients with malabsorption. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 141(6), 411.
- Prieto, P. G., Cancelas, J., Villanueva-Peñacarrillo, M. L., Malaisse, W. J., & Valverde, I. (2006). Short-term and long-term effects of guar on postprandial plasma glucose, insulin and glucagon-like peptide 1 concentration in healthy rats. *Hormone and Metabolic Research*, 38(6), 397-404.

- Puiggrós, C., Chacón, P., Armadans, L. I., Clapés, J., & Planas, M. (2002). Effects of oleic-rich and omega-3-rich diets on serum lipid pattern and lipid oxidation in mildly hypercholesterolemic patients. *Clinical Nutrition*, 21(1), 79-87.
- Pylkas, A. M., Juneja, L. R., & Slavin, J. L. (2005). Comparison of different fibers for In Vitro production of short chain fatty acids by intestinal microflora. *Journal of Medicinal Food*, 8(1), 113-116.
- Raafat, D., & Sahl, H. -. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2 SPEC. ISS.), 186-201.
- Reaven, P. D., Grasse, B. J., & Tribble, D. L. (1994). Effects of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with α -tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14(4), 557-566.
- Reiner, Ž, Catapano, A. L., De Backer, G., Graham, I., Taskinen, M. -. , Wiklund, O., Agewall, S., Alegria, E., Chapman, M. J., Durrington, P., Erdine, S., Halcox, J., Hobbs, R., Kjekshus, J., Filardi, P. P., Riccardi, G., Storey, R. F., & Wood, D. (2011). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *European heart journal*, 32(14), 1769-1818.
- Rhee, S. K., Kayani, A. J., Ciszek, A., & Brenna, J. T. (1997). Desaturation and interconversion of dietary stearic and palmitic acids in human plasma and lipoproteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(2), 451-458.
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*, 47(2), 241-259.
- Rioux, V., Catheline, D., & Legrand, P. (2007). In rat hepatocytes, myristic acid occurs through lipogenesis, palmitic acid shortening and lauric acid elongation. *Animal*, 1(6), 820-826.
- Rodrigues, M. R., & De Oliveira, H. P. M. (2012). Use of chitosan in the treatment of obesity: Evaluation of interaction with vitamin B12. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(5), 548-552.

- Rose, D. J., DeMeo, M. T., Keshavarzian, A., & Hamaker, B. R. (2007). Influence of dietary fiber on inflammatory bowel disease and colon cancer: Importance of fermentation pattern. *Nutrition reviews*, 65(2), 51-62.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 115-126.
- Roy, S., Vega-Lopez, S., & Fernandez, M. L. (2000). Gender and hormonal status affect the hypolipidemic mechanisms of dietary soluble fiber in guinea pigs. *Journal of Nutrition*, 130(3), 600-607.
- Ruiz-Canela, M., & Martínez-González, M. A. (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, 68(3), 245-250.
- Ruiz-Roso, B., & Pérez-Olleros, L. (2010). Preliminary results on dietary fibre intake in Spain and health benefits associated to soluble fiber intake. *Revista Espanola de Nutricion Comunitaria*, 16(3), 147-153.

-S-

- Sala-Vila, A., Cofán, M., Mateo-Gallego, R., Cenarro, A., Civeira, F., & Ros, E. (2013). Eicosapentaenoic acid in serum phospholipids relates to a less atherogenic lipoprotein profile in subjects with familial hypercholesterolemia. *Journal of Nutritional Biochemistry*. In press.
- Sánchez-Muniz, F. J. (2012). Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 27(1), 31-45.
- Sato, F., Saito, A., Miyawaki, H., Takehara, I., Miyakoshi, T., & Takahashi, N. (2009). Effect of beverage containing resistant maltodextrin on postprandial serum triglyceride and the safety evaluation of long-term or excessive intake of the beverage. *Japanese Pharmacology and Therapeutics*, 37(10), 857-866.
- Scharlau, D., Borowicki, A., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Miene, C., Munjal, U., Stein, K., & Gleib, M. (2009). Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 682(1), 39-53.

- Schmitz, G., Langmann, T., & Heimerl, S. (2001). Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *Journal of lipid research*, 42(10), 1513-1520.
- Schneider, C., Cowles, R., & Stuefer-Powell, CL and Carr, TP (2000). Dietary Stearic Acid Reduces Cholesterol Absorption and Increases Endogenous Cholesterol Excretion in Hamsters Fed Cereal-Based Diets. *Journal of Nutrition, The*, 130(5), 1232.
- Schneider, C., Cowles, R., Stuefer-Powell, C., & Carr, T. (2000). Dietary stearic acid reduces cholesterol absorption and increases endogenous cholesterol excretion in hamsters fed cereal-based diets. *Journal of Nutrition, The*, 130(5), 1232.
- Serhan, C. N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S. P., Devchand, P. R., Mirick, G., & Moussignac, R. -. (2002). Resolvins: A family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *Journal of Experimental Medicine*, 196(8), 1025-1037.
- Shahidi, F. (2007). Chitin and chitosan from marine by-products. In F. Shahidi, *Maximising the value of marine by-products* (pp. 340-373). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Sheltawy, M. J., & Losowsky, M. S. (1975). Determination of faecal bile acids by an enzymic method. *Clinica Chimica Acta*, 64(2), 127-132.
- Siddiqui, R. A., Shaikh, S. R., Sech, L. A., Yount, H. R., Stillwell, W., & Zaloga, G. P. (2004). Omega 3-fatty acids: Health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4(8), 859-871.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine pharmacotherapy*, 60(9), 502.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 56(8), 365.
- Simopoulos, A. P. (1994). Is insulin resistance influenced by dietary linoleic acid and trans fatty acids? *Free Radical Biology and Medicine*, 17(4), 367-372.
- Simunek, J., & Bartonova, H. (2005). Effect of dietary chitin and chitosan on cholesterolemia of rats. *Acta veterinaria*, 74(4), 491.

- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(2), 522-525.
- Slavin, J. L. (2008). How fiber affects weight regulation. *Food technology*, 62(2), 34.
- Slavin, J. L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition*, 21(3), 411-418.
- Sociedad Española de Cardiología (2011). Colesterol: Riesgo de colesterol alto. <http://www.fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular/colesterol.html>. Última consulta: 16/02/2013
- Solà, R., Bruckert, E., Valls, R. -, Narejos, S., Luque, X., Castro-Cabezas, M., Doménech, G., Torres, F., Heras, M., Farrés, X., Vaquer, J. -, Martínez, J. -, Almaraz, M. -, & Anguera, A. (2010). Soluble fibre (*Plantago ovata* husk) reduces plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides, insulin, oxidised LDL and systolic blood pressure in hypercholesterolaemic patients: A randomised trial. *Atherosclerosis*, 211(2), 630-637.
- Spapen, H., Dilltoer, M., Van Malderen, C., Opdenacker, G., Suys, E., & Huyghens, L. (2001). Soluble fiber reduces the incidence of diarrhea in septic patients receiving total enteral nutrition: A prospective, double-blind, randomized, and controlled trial. *Clinical Nutrition*, 20(4), 301-305.
- Sprecher, H. (2003). Essential Fatty Acids. In Y. Huang, P. Huang, & S. Lin, *Essential Fatty Acids and Eicosanoids*: AOCs Publishing.
- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free radical research*, 40(12), 1250-1258, doi:10.1080/10715760600918142 ER.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull Jr., W., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the council on arteriosclerosis, American heart association. *Circulation*, 92(5), 1355-1374.
- Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 20963-20966.

- Stocker, R., & Keane Jr., J. F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84(4), 1381-1478.
- Stubbs, R. J., & Tolcamp, B. J. (2006). Control of energy balance in relation to energy intake and energy expenditure in animals and man: An ecological perspective. *British Journal of Nutrition*, 95(4), 657-676.
- Sugamura, K., & Keane Jr., J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 978-992.
- Sugano, M., Watanabe, S., Kishi, A., Izume, M., & Ohtakara, A. (1988). Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids*, 23(3), 187-191.
- Sugano, M., Fujikawa, T., & Hiratsuji, Y. (1980). A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *American Journal of Clinical Nutrition*, 33(4), 787-793.
- Sulkers, E. J., Lafeber, H. N., Degenhart, H. J., Lindemans, J., & Sauer, P. J. J. (1992). Comparison of two preterm formulas with or without addition of medium- chain triglycerides (MCTs). II: Effects on mineral balance. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 15(1), 42-47.
- Sumiyoshi, M., & Kimura, Y. (2006). Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(2), 201-207.

-T-

- Takahashi, H., Akachi, S., Ueda, Y., Akachi, S., Kim, M., Hirano, K., & Yamamoto, T. (1995). Effect of liquid diets with or without partially hydrolyzed guar gum on intestinal microbial flora and function of rats. *Nutrition Research*, 15(4), 527-536.
- Takahashi, H., Wako, N., Okubo, T., Ishihara, N., Yamanaka, J., & Yamamoto, T. (1994). Influence of partially hydrolyzed guar gum on constipation in women. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 40(3), 251-259.

- Takahashi, T., Yokawa, T., Ishihara, N., Okubo, T., Chu, D. -, Nishigaki, E., Kawada, Y., Kato, M., & Raj Juneja, L. (2009). Hydrolyzed guar gum decreases postprandial blood glucose and glucose absorption in the rat small intestine. *Nutrition Research*, 29(6), 419-425.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., & Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45(4), 713-719.
- Tapola, N., Karvonen, H., Niskanen, L., Mikola, M., & Sarkkinen, E. (2005). Glycemic responses of oat bran products in type 2 diabetic patients. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 255-261.
- Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M., & Legrand, A. (2000). Biomarkers of oxidative stress: An analytical approach. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 3(5), 373-384.
- Theuwissen, E., & Mensink, R. P. (2008). Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior*, 94(2), 285.
- Trowell, H. (1976). Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 29(4), 417-427.
- Trowell, H. (1974). Editorial: Definitions of fibre. *Lancet*, 1(7856), 503.
- Trowell, H. (1972). Ischemic heart disease and dietary fiber. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25(9), 926-932.
- Tsujita, T., Takaichi, H., Takaku, T., Sawai, T., Yoshida, N., & Hiraki, J. (2007). Inhibition of lipase activities by basic polysaccharide. *Journal of lipid research*, 48(2), 358-365.
- Tudorică, C. M., Kuri, V., & Brennan, C. S. (2002). Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 347-356.

-U-

- U.S. Department of Agriculture (USDA) (2011). National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>.

USA, American Association of Cereal Chemists. (2001). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46(3), 112-129.

-V-

Van Der Velde, A. E., Brufau, G., & Groen, A. K. (2010). Transintestinal cholesterol efflux. *Current opinion in lipidology*, 21(3), 167-171.

Varum, K., & Smidsrod, O. (2006). Chitosans. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, & P. A. Williams, *Food Polysaccharides and Their Applications* (pp. 497-520). : CRC Press.

Velázquez, M., Davies, C., Marett, R., Slavin, J. L., & Feirtag, J. M. (2000). Effect of oligosaccharides and fibre substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. *Anaerobe*, 6(2), 87-92.

Vemuri, M., & Kelley, D. (2007). The Effects of Dietary Fatty Acids on Lipid Metabolism. In C. K. Chow, *Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Third Edition* (pp. 591-630). CRC Press.

Viuda-Martos, M., López-Marcos, M. C., Fernández-López, J., Sendra, E., López-Vargas, J. H., & Perez-Álvarez, J. A. (2010). Role of fiber in cardiovascular diseases: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 240-258.

Vogt, J. A., & Wolever, T. M. S. (2003). Fecal acetate is inversely related to acetate absorption from the human rectum and distal colon. *Journal of Nutrition*, 133(10), 3145-3148.

Volpe, J. J., & Vagelos, P. R. (1976). Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids. *Physiological Reviews*, 56(2), 339-417.

Vrzhesinskaya, O. A., Kodentsova, V. M., Beketova, N. A., Kosheleva, O. V., & Pereverzeva, O. G. (2011). The effect of various levels of chitosan in rat diet on vitamins assimilation under their combined deficiency. *Voprosy pitaniia*, 80(4), 56-61.

-W-

- Wakabayashi, S., Kishimoto, Y., Nanbu, S., & Matsuoka, A. (1999). Effects of indigestible dextrin on postprandial rise in blood glucose levels in man. *J Jpn Assoc Dietary Fiber Res*, 3, 13-19.
- Wakil, S. J., Stoops, J. K., & Joshi, V. C. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 52, 537-579.
- Walker, A. R. (1956). Some aspects of nutritional research in South Africa. *Nutrition reviews*, 14(11), 321-324.
- Wärnberg, J., Marcos, A., Bueno, G., & Moreno, L. A. (2009). Functional benefits of psyllium fiber supplementation. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 7(2), 55-64.
- Watson, R. R. (2009). *Fatty acids in health promotion and disease causation*. Urbana, Ill.: AOCS Press.
- Weber, O., Bischoff, H., Schmeck, C., & Böttcher, M. -. (2010). Cholesteryl ester transfer protein and its inhibition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(18), 3139-3149.
- Willett, W. C. (2012). Dietary fats and coronary heart disease. *Journal of internal medicine*, 272(1), 13-24.
- Wolever, T. M. S., Gibbs, A. L., Brand-Miller, J., Duncan, A. M., Hart, V., Lamarche, B., Tosh, S. M., & Duss, R. (2011). Bioactive oat -glucan reduces LDL cholesterol in Caucasians and non-Caucasians. *Nutrition Journal*, 10(1).
- Wolever, T. M. S., Fernandes, J., & Rao, A. V. (1996). Serum acetate:propionate ratio is related to serum cholesterol in men but not women. *Journal of Nutrition*, 126(11), 2790-2797.
- Wolever, T. M. S., Brighenti, F., Royall, D., Jenkins, A. L., & Jenkins, D. J. A. (1989). Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *American Journal of Gastroenterology*, 84(9), 1027-1033.
- Wong, J. M. W., De Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., & Jenkins, D. J. A. (2006). Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(3), 235-243.

- Wong, J., Kendall, C., & Jenkins, D. (2009). Fermentation of Prebiotics and Short-Chain Fatty Acid Production. In E. Finocchiaro, & S. Sungsoo, *Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients*: CRC Press.
- Woollett, L. A., Spady, D. K., & Dietschy, J. M. (1992). Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *Journal of lipid research*, 33(1), 77-88.
- World Health Organization, & Food and Agriculture Organization of the United Nations (1994). Fats and oils in Human Nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, Italy, 19-26 October 1993.
- World Health Organization (WHO) (2012a). OMS | Enfermedades cardiovasculares. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>. Última consulta: 15/2/2013
- World Health Organization (WHO) (2012b). Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N°311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. Última consulta: , 16/2/2013
- World Health Organization (WHO) (2011a). Causes of death 2008. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf. Última consulta: 14/2/2013-
- World Health Organization (WHO) (2011b). *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*.
- World Health Organization (WHO) (2011c). Global status report on noncommunicable diseases 2010.
- World Health Organization (WHO) (2004). Fomento del consumo mundial de frutas y verduras. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/index1.html>. Última consulta: 27/3/2013
- World Health Organization (WHO) (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases (WHO technical report series; 916)*. : WHO Technical Report Series.
- World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO) (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916 Geneva.

Wu, T., Fu, J., Yang, Y., Zhang, L., & Han, J. (2009). The effects of phytosterols/stanols on blood lipid profiles: A systematic review with meta-analysis. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 18(2), 179-186.

Wydro, P., Krajewska, B., & Hac-Wydro, K. (2007). Chitosan as a lipid binder: A Langmuir monolayer study of chitosan - Lipid interactions. *Biomacromolecules*, 8(8), 2611.

-X-

Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170-179.

Xie, C., Woollett, L. A., Turley, S. D., & Dietschy, J. M. (2002). Fatty acids differentially regulate hepatic cholesteryl ester formation and incorporation into lipoproteins in the liver of the mouse. *Journal of lipid research*, 43(9), 1508-1519.

-Y-

Yamada, K., Tokunaga, Y., Ikeda, A., Ohkura, K. -, Kaku-Ohkura, S., Mamiya, S., Beong, O. L., & Tachibana, H. (2003). Effect of dietary fiber on the lipid metabolism and immune function of aged Sprague-Dawley rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(2), 429-433.

Yao, H. -, Lii, C. -, Chou, R. -, Lin, J. -, Yang, H. -, & Chiang, M. -. (2010). Effect of chitosan on hepatic drug-metabolizing enzymes and oxidative stress in rats fed low- and high-fat diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5187-5193.

Ye, P., Cheah, I. K., & Halliwell, B. (2013). High fat diets and pathology in the guinea pig. Atherosclerosis or liver damage? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(2), 355-364.

Yokoyama, W., Anderson, W. H. K., Albers, D. R., Hong, Y. -, Langhorst, M. L., Hung, S. -, Lin, J. -, & Young, S. A. (2011). Dietary hydroxypropyl methylcellulose increases excretion of saturated and trans fats by hamsters fed fast food diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11249-11254.

Yoon, S. -, Chu, D. -, & Juneja, L. R. (2008a). Chemical and physical properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42(1), 1-7.

Yoon, S. -, Chu, D. -, & Juneja, L. R. (2008b). Chemical and physical properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42(1), 1-7.

Yoon, S. -, Chu, D. -, & Juneja, L. R. (2006). Physiological functions of partially hydrolyzed guar gum. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 39(3), 134-144.

-Z-

Zhang, J., Zhang, W., Mamadouba, B., & Xia, W. (2012). A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats. *International journal of biological macromolecules*, 51(4), 504-508.

Zock, P. L., Mensink, R. P., Harryvan, J., De Vries, J. H. M., & Katan, M. B. (1997). Fatty acids in serum cholesteryl esters as quantitative biomarkers of dietary intake in humans. *American Journal of Epidemiology*, 145(12), 1114-1122.

8. ANEXO

8.1. ABREVIACIONES

AA	Ácido araquidónico
AB	Ácidos biliares
ABCA1/ G5/ G8	<i>ATP-binding cassette transporters A1, G5 o G8</i>
ACAT	<i>Acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase</i>
AG	Ácido graso(s)
AGI	Ácido(s) graso(s) insaturado(s)
AGMI	Ácido(s) graso(s) monoinsaturado(s)
AGPI	Ácido(s) graso(s) poliinsaturado(s)
AGS	Ácido(s) graso(s) saturado(s)
ALA	Ácido α -linolénico
AO	Ácido oleico
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CCK	Colecistoquinina
CH	Quitosano
DPPP	Difenil-1-pirenil fosfina
DHA	Ácido docosahexaenoico
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GG	Goma guar
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
HDL	Lipoproteína(s) de alta densidad
HETE	Ácido(s) hidroxieicosatetranoico
HMG-CoA-red	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HP	Hidroperóxido
HV	Quitosano de alta viscosidad
IDL	Lipoproteína(s) de densidad intermedia
OMS	Organización Mundial de la Salud
LA	Ácido linoleico
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteína(s) de baja densidad
LDLox	Lipoproteína(s) de baja densidad oxidada(s)
LPL	Lipoproteína lipasa
LV	Quitosano de baja viscosidad
LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
MD	Maltodextrina resistente a la digestión
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>

NS	Esteroles neutros
PG	Prostaglandinas
PHGG	Goma guar parcialmente hidrolizada
SCD1	Estearoil-CoA desaturasa
SCFA	Ácido(s) graso(s) de cadena corta
SREBP	<i>Sterol regulatory binding protein</i>
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
TAG	Triglicéridos
TICE	<i>Transintestinal cholesterol efflux</i>
TNF-α	Factor tumoral necrosis alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TX	Tromboxano(s)
VLDL	Lipoproteína(s) de muy baja densidad

8.2. LISTADO DE TABLAS

Tabla 1-1: Principales enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo	20
Tabla 1-2: Clases de lipoproteínas y apolipoproteínas.....	29
Tabla 1-3. Resumen de efectos de diferentes ácidos grasos.....	36
Tabla 1-4: Recomendaciones de consumo de grasa y fibra alimentaria en adultos.....	46
Tabla 1-5: Clasificación de fibras alimentarias y ejemplos de fuentes de obtención	53
Tabla 1-6: Ejemplos de aplicaciones del quitosano.....	71
Tabla 5-1: Propiedades del método de determinación de hidroperóxidos totales en plasma mediante el fluoróforo difenil-1-pirenilfosfina	215

8.3. LISTADO DE FIGURAS

Figura 1-1: Tasa bruta de mortalidad por causas específicas en Europa y España (Año 2010)	19
Figura 1-2: Evolución de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en diferentes países. ...	22
Figura 1-3: Proceso resumido de formación de la placa aterosclerótica	25
Figura 1-4: Metabolismo del colesterol resumido	31
Figura 1-5: Biosíntesis de ácidos grasos n-6 y n-3 de cadena larga	41
Figura 1-6: Principales monósacaridos contituyentes de fibras alimentarias	51
Figura 1-7: Monómeros fenólicos estructurales típicos de la lignina	51
Figura 1-8: Resumen de efectos beneficiosos del consumo de fibras alimentarias	56
Figura 1-9: Estructura química de la goma guar	64
Figura 1-10: Estructura de la maltodextrina resistente a la digestión	67
Figura 1-11: Estructura de polímeros de celulosa, quitina y quitosano.	69
Figura 3-1: Resumen y comparación de análisis realizados en la primera y en la segunda fase experimental.	92
Figura 5-1: Eficiencia alimentaria y evolución del peso de los animales (<i>Primera fase experimental</i>)	196
Figura 5-2: Consumo de pienso y eficiencia alimentaria (<i>Segunda fase experimental</i>) ...	197
Figura 5-3: Efecto de las fibras estudiadas sobre la excreción de esteroides y la concentración <i>in vivo</i> de colesterol.	199
Figura 5-4: Efecto de las fibras estudiadas sobre el perfil de esteroides en heces (<i>Primera fase experimental</i>).	202
Figura 5-5: Excreción total de ácidos grasos.	203
Figura 5-6: Excreción de los principales ácidos grasos presentes en la dieta (<i>Primera fase experimental</i>)	204
Figura 5-7: Correlación entre el número de carbonos de los principales ácidos grasos saturados y el efecto del quitosano sobre su excreción	206
Figura 5-8: Relación de ácidos grasos saturados/insaturados y n-6/n-3 en heces plasma e hígado (<i>Segunda fase experimental</i>)	207

Figura 5-9: Porcentaje de ácidos grasos en plasma e hígado (<i>Segunda fase experimental</i>)	209
Figura 5-10: Concentración de ácido araquidónico en relación a los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico (<i>Segunda fase experimental</i>).....	212
Figura 5-11: Propiedades fluorimétricas de la difenil-1-pirenil fosfina (DPPP).	215
Figura 5-12: Concentración de hidroperóxidos totales en plasma (<i>Segunda fase experimental</i>)	216
Figura 5-13: Esquema de mecanismo de floculación por depleción.....	219
Figura 5-14: Mecanismo de interacción entre el quitosano y ácidos grasos	222