

————— *Artículo original* —————

## **Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta**

Recibido el 20 de septiembre de 2007

ASTIASARÁN, ICÍAR\* ; ANSORENA, DIANA; ECHARTE, MAIDER; CONCHILLO, ANA; MENÉNDEZ-CARREÑO, MARÍA  
*Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. Irunlarrea s.n., 31008 Pamplona*

### **RESUMEN**

Los productos de oxidación del colesterol (COPs) poseen demostrados efectos tóxicos y están implicados en el desarrollo de aterosclerosis. Pueden estar presentes en organismos animales y por ende, en alimentos de origen animal, siendo susceptibles de ser absorbidos a través de la dieta. Su formación en los alimentos se favorecería, al tratarse de un proceso de oxidación química, por la elevación de la temperatura y la presencia de oxígeno. En este trabajo se presenta una estimación de la presencia de COPs en diferentes tipos de alimentos cocinados mediante diferentes tecnologías culinarias y almacenados mediante distintas modalidades de conservación. El análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Tanto pescados (salmón y langostinos) como carnes (hamburguesas, pechugas de pollo, lomo y salchichas tipo frankfurt) mostraron valores bajos de COPs en crudo (0.003-0.552 mg/100 g alimento), incrementándose significativamente tras el cocinado (hasta 0.7 mg/100 g alimento). El cocinado con microondas supuso el mayor incremento de COPs en comparación con la fritura, plancha y asado. El almacenamiento a vacío disminuyó drásticamente la formación de COPs

---

#### **\* Información de contacto:**

Dra. Iciar Astiasarán.  
Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. Irunlarrea s.n., 31008 Pamplona.  
Tel: 948425600- Ext. 6405. Fax: 948425649  
e-mail : iastiasa@unav.es

respecto al almacenamiento en aerobiosis. La congelación ralentizó más eficazmente la formación de COPs que la refrigeración.

**Palabras clave:** COPs, oxidación, aterosclerosis, tecnologías culinarias, microondas.

## ABSTRACT

### **Cholesterol oxidation products in common cooked foods.**

Cholesterol oxidation products (COPs) have shown different toxic effects and are involved in the development of atherosclerosis. These compounds can be found in animal organisms, and in consequence in animal origin foods, and they are susceptible to be absorbed from the diet. Their formation in foods would be increased by high temperatures and the presence of oxygen, as it is a chemical oxidation process. In this paper, an estimation of the presence of COPs in different types of foods treated by different cooking technologies are shown. Also different storage conditions are studied. The analysis was carried out by gas chromatography-mass spectrometry. Both fish (salmon and shrimps) and meat (hamburgers, breast chicken, pork loin and frankfurters) showed low COPs values in raw products (0.003-0.552 mg/100 g food), increasing significantly after the application of cooking technologies (up to 0.7 mg/100 g food). Microwave treatment led to the highest increase of COPs in comparison to frying, grilling and roasting. Vacuum storage dramatically decreased COPs formation with regard to aerobic storage. Freezing minimized COPs formation more efficiently than refrigeration.

**Key words:** oxidation, atherosclerosis, cooking technologies, microwaves.

## INTRODUCCIÓN

Las primeras citas acerca de la existencia de óxidos de colesterol, también denominados COPs (colesterol oxidation products) en productos animales data de 1940. En la década de los 80 gracias a los avances de la técnicas cromatográficas se comienza a cuantificar e identificar este tipo de compuestos en diversos alimentos. Fue Smith en 1981 (1) quien llegó a sugerir que los hidroperóxidos formados durante la oxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados podrían iniciar la oxidación del colesterol. En 1995, Paniagvait et al. (2) publicaron una revisión en la que se recogen todos los trabajos realizados hasta la fecha sobre presencia de óxidos de colesterol en diversos tipos de alimentos. Paralelamente fueron apareciendo evi-

dencias científicas que demuestran que los óxidos de colesterol constituyen un potencial riesgo para la salud, ya que la mayoría tienen efectos biológicos adversos. En 1999, Tai et al. (3) publicaron una nueva revisión sobre análisis, formación e inhibición de los productos de oxidación del colesterol en alimentos, en la que se afirma que estos productos están adquiriendo cada vez más relieve en relación con la seguridad del consumidor.

Desde entonces se han identificado más de 70 óxidos de colesterol pero son 8 a los que más atención se les ha prestado: 7 $\alpha$ -hidroxicoolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol 7-cetocolesterol, 20 y 25-hidroxicoolesterol, 5, 6 $\alpha$ -epoxicoolesterol, 5, 6 $\beta$ -epoxicoolesterol y colestaneetriol ya que son los que más comúnmente se encuentran en los alimentos.

En los últimos 30 años a los COPs se les ha atribuido diversos efectos tóxicos. Se han establecido efectos citotóxicos en diversas líneas celulares: tejido muscular, fibroblastos y células endoteliales de vasos sanguíneos (4-7). Hay varias investigaciones que muestran la inducción de apoptosis celular por parte de estos compuestos (8). Se han comprobado efectos mutagénicos para varios de ellos (9, 10) y se han establecido correlaciones entre diversos óxidos de colesterol y cáncer de colon, mama y próstata (11-13). Asimismo, pueden interferir en la regulación del metabolismo de otros compuestos esteroideos y en concreto producen la inhibición de la actividad 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que regula la síntesis de colesterol (14). Pero quizá, el efecto más conocido y por el que se les ha dado más importancia, es su implicación en los procesos de aterosclerosis (15-16).

Larsson et al. (8) en un estudio *in vitro* sobre el efecto de una mezcla de oxiesteroles (24-hidroxicoolesterol, 27-hidroxicoolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol y 7-cetocolesterol) establecieron que los 4 COPs más abundantes en las lesiones de ateroma humano son proapoptóticos y podrían contribuir al desarrollo de la lesión aterosclerótica. En concreto, se podría pensar, según señala Lizard (17) en un reciente artículo sobre el interés clínico de los resultados obtenidos en dicho trabajo, que el riesgo de aterosclerosis depende probablemente de la relación entre los diferentes oxiesteroles, especialmente 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol/7-cetocolesterol/27-hidroxicoolesterol/25-hidroxicoolesterol lo que, según este investigador, conduce a la suposición de

que la simultánea identificación y cuantificación de estos compuestos puede contribuir a definir la relación entre los COPs y los acontecimientos que se producen durante el proceso de aterosclerosis, tales como la ausencia o presencia de marcadores fenotípicos de oxidación y de apoptosis en las lesiones ateroscleróticas.

La posibilidad de absorción a partir de la dieta se ha puesto en evidencia, aunque existe controversia acerca de los porcentajes de absorción para los diferentes compuestos (18, 19).

En este trabajo se trata de ofrecer una estimación, basada en los diversos trabajos de nuestro grupo de investigación, de la presencia de COPs en diferentes tipos de alimentos cocinados mediante diferentes tecnologías culinarias y modalidades de conservación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las distintas muestras objeto de estudio (pechugas de pollo, salmón (*Salmo salar*), hamburguesas de ternera, hamburguesas de pollo, salchichas y langostinos frescos y congelados (*Penaeus vannamei*)) fueron adquiridas en el mercado. Cada muestra se analizó por cuadruplicado en crudo y tras ser sometida a distintas tecnologías culinarias habituales para cada uno de los alimentos (20-30). La tecnología de fritura se aplicó con aceite de oliva (180°C) en las muestras de salmón y hamburguesas, y con aceite de girasol (160-180°C) en las muestras de lomo, alcanzando temperaturas en el interior del alimento del orden de 85-90°C. El asado se aplicó en muestras de salmón y pechuga de pollo, alcanzando temperaturas entre 95-100°C. El microondas se aplicó en salmón, hamburguesas, pechuga de pollo y salchichas, a una potencia de 650W, alcanzando temperaturas entre 82-88°C en el interior de los alimentos. La plancha se utilizó en el caso de los langostinos y pechugas de pollo, a una temperatura de 180°C, durante 1.5 min por cada lado, alcanzando temperaturas en el interior de los alimentos del orden de 85-90°C. En todos los casos las temperaturas internas se midieron con un termómetro digital (51 J/K RS 614-299, Fluke, USA).

Para el estudio de las condiciones de almacenamiento de pechugas de pollo se introdujeron las muestras cocinadas en bolsas de

plástico de poliamida/polietileno 90  $\mu\text{m}$  (Corsan, Pamplona, España) y se cerraron en condiciones de aerobiosis o a vacío (selladora Modelo VP-1000, Ramon, Barcelona, España). Se mantuvieron durante 6 días en condiciones de refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ) o durante 3 meses en congelación ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

Tanto en las muestras crudas como cocinadas se analizaron los siguientes parámetros de composición general: grasa mediante la Norma internacional AOAC 960.39 (31), colesterol por el método descrito por Kovacs et al. (32). La extracción lipídica con cloroformo/metanol (2/1) se realizó mediante el método de Folch et al. (33).

Determinación de Óxidos de colesterol: la saponificación en frío, purificación en cartuchos de sílice y derivatización se llevaron a cabo según el método descrito por Guardiola et al. (34). La posterior separación, identificación y cuantificación de los trimetilsililéteres de los óxidos de colesterol se llevó a cabo según el protocolo descrito en Echarte et al. (20). Se empleó un Cromatógrafo de gases HP 6890 GC System (Hewlett-Packard) acoplado a un detector de masas 5973 Mass Selective Detector (Hewlett-Packard). Las condiciones cromatográficas fueron: Columna: HP-5MS (30m 250  $\mu\text{m}$  diámetro interno  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  espesor fase); Gas portador: Helio (1 ml/min); Temperatura del inyector:  $250^{\circ}\text{C}$ ; Temperatura del horno:  $80^{\circ}\text{C}$ , mantenida durante 1 min y rampa hasta  $250^{\circ}\text{C}$  ascendiendo a  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , seguida de una segunda rampa hasta  $280^{\circ}\text{C}$  a  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  manteniéndose esa temperatura durante 20 min. En la Figura 1 se muestra un cromatograma que muestra el orden de elución y los tiempos de retención de los ocho compuestos analizados.

Para la estimación de la ingesta de óxidos de colesterol de distintos alimentos cocinados se estableció la ración de carnes en 125 g y la de pescados y mariscos en 150 g, de acuerdo con los criterios expuestos en Muñoz et al. (35).

Tratamiento estadístico: Las tablas y gráficos muestran los valores medios obtenidos para cada uno de los parámetros en estudio. Se determinó la t de Student para establecer diferencias significativas entre las muestras crudas y cocinadas. Se consideraron diferencias significativas con un valor de  $p \geq 0.05$ . El programa estadístico aplicado fue SPSS (SPSS 9.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, Ill.)

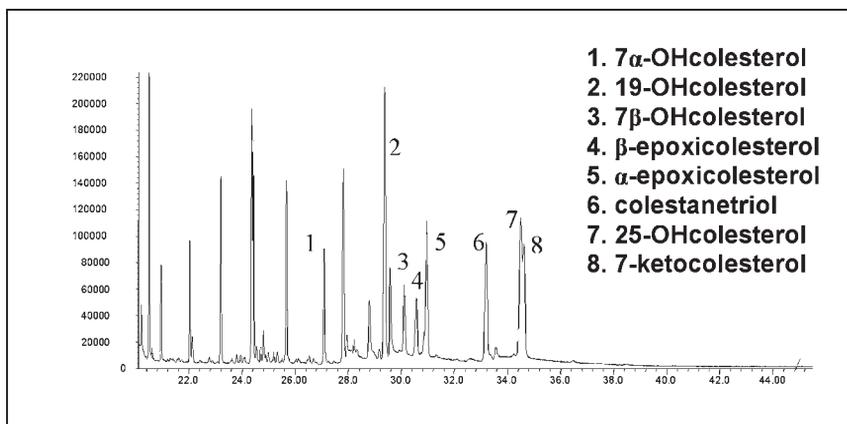


FIGURA 1. *Cromatograma correspondiente al análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de una mezcla de patrones de óxidos de colesterol.*

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede afirmar que son 3 los factores que influyen en la formación de óxidos de colesterol en los alimentos: la naturaleza del producto alimenticio, el tipo de procesado industrial o culinario aplicado y las condiciones de almacenamiento. Los óxidos de colesterol se forman en la mayoría de los productos procesados que contienen colesterol, siendo difícil prevenir su formación (36).

Los resultados de los trabajos realizados por nuestro grupo pusieron de manifiesto que todos los alimentos analizados, tanto pescados (salmón, langostinos) como carnes (hamburguesas, pechugas de pollo, lomo y salchichas tipo frankfurt) presentaron bajos valores de óxidos de colesterol en crudo (Figuras 2-5). En el caso de los pescados el contenido total de COPs fue inferior a 0.01 mg/100 g alimento, para salmón y langostinos congelados, no así en los langostinos refrigerados en los que se elevó a 0.03 mg/100 g. En este caso existe una clara influencia del método de conservación aplicado, tal y como se comentará posteriormente.

En las muestras de carnes los resultados fueron más variables, así las hamburguesas mostraron valores de 0.02 a 0.04 mg/100 g. La diferente especie, ternera y pollo, de las hamburguesas podría expli-

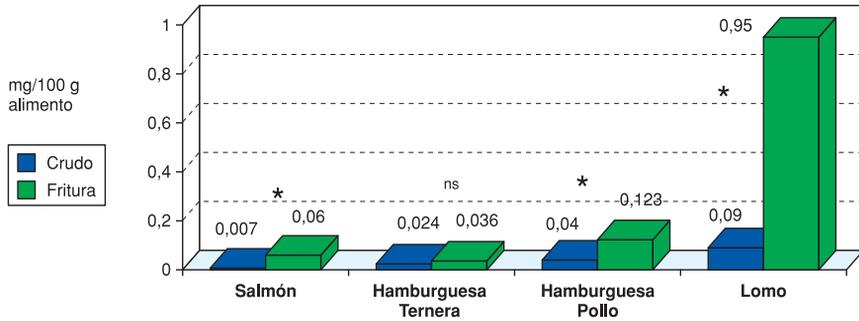


FIGURA 2. Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante fritura. \*  $p < 0.05$ ; ns  $p > 0.05$ .

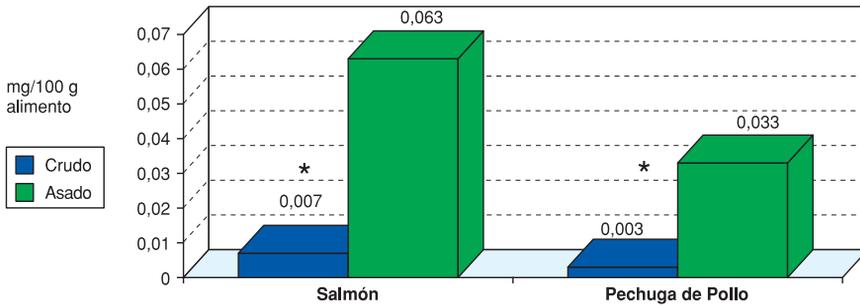


FIGURA 3. Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante asado. \*  $p < 0.05$ .

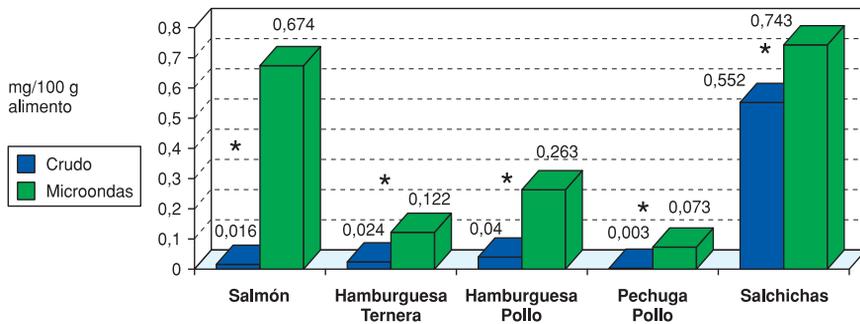


FIGURA 4. Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante microondas. \*  $p < 0.05$ .

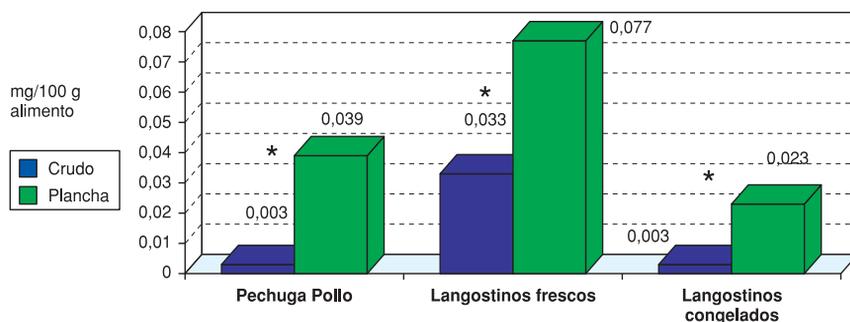


FIGURA 5. *Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante fritura. \* p < 0.05.*

car la diferencia encontrada entre ambas muestras. Parece demostrado que la mayor presencia de insaturaciones, es decir, alimentos ricos en ácidos grasos insaturados, especialmente poliinsaturados, favorece la formación de óxidos a partir del colesterol presente. Las pechugas de pollo mostraron valores muy bajos (0.003 mg/100 g) que estarían acordes con los bajos porcentajes de grasa de estas muestras. Por el contrario, el lomo y las salchichas mostraron los valores mas altos (0.09 y 0.552 mg/100 g alimento, respectivamente).

Hay que tener en cuenta que productos como hamburguesas y especialmente las salchichas están condicionados no sólo por la naturaleza de la especie animal utilizada como ingrediente, sino también por las operaciones de procesado utilizadas en su elaboración. Ambos alimentos han sufrido una operación de picado que favorece los procesos oxidativos. Además, en el caso de las salchichas se ha producido también un calentamiento por el tratamiento de pasterización, lo que explicaría el máximo valor obtenido en estos alimentos en crudo.

El tratamiento culinario supuso un incremento en el contenido de COPs de todos los alimentos analizados. Las figuras muestran que, efectivamente, salvo en el caso de las hamburguesas de ternera cocinadas mediante la aplicación de fritura, se produjo un incremento significativo del total de COPs en el producto cocinado frente al alimento crudo. Diversos trabajos en la bibliografía muestran incrementos en la concentración de óxidos en alimentos cocinados a temperaturas de 85°C (37-40). Sarantinos et al. (41) señalaron que tiempos prolongados de cocinado incrementaban el contenido de

COPs en huevos fritos y cocidos. Estos mismos autores mostraron que mientras que en huevos o leche calentados menos del 5% del colesterol se transformaba en COPs, en productos elaborados con huevos y/o leche el porcentaje de transformación era del 20-45.7% en galletas, 16-29% en pasteles y 37.2% en mayonesa.

La Figura 6 representa el incremento en COPs de las muestras que fueron sometidas a diferentes tecnologías culinarias. En todos los trabajos realizados se pudo observar que la aplicación del cocinado con microondas supuso el mayor incremento de COPs, frente al resto de tecnologías aplicadas (fritura, asado y plancha). Aunque no se ahondó en estos resultados, probablemente los diferentes mecanismos de transmisión de calor tengan una influencia determinante en los procesos de oxidación del calor, independientemente de la temperatura aplicada. Tal y como se recoge en el apartado de material y métodos, la temperatura interna alcanzada en el calentamiento por microondas fue del mismo orden que las alcanzadas con el resto de tecnologías. El salmón cocinado con microondas presentó el mayor incremento respecto al alimento en crudo (un contenido en COPs 42 veces superior al contenido en crudo). Le siguió la pechuga de pollo cocinada también con microondas (24 veces superior a la pechuga cruda).

También fue objeto de uno de nuestros trabajos el observar la influencia de las diferentes condiciones de almacenamiento de alimentos ya cocinados en el contenido en COPs de los mismos. La Figura 7 muestra los resultados obtenidos para pechugas de pollo cocinadas con diferentes tecnologías y conservadas en condiciones de refrigeración y congelación tanto en condiciones de aerobiosis como a vacío (29).

Puesto que la formación de óxidos de colesterol en los alimentos se produce fundamentalmente vía formación de radicales libres a través de mecanismos de oxidación, cabría esperar que la ausencia de oxígeno pueda reducir su formación durante el almacenamiento. Finocchiaro et al. (37) observaron que la mantequilla envasada en atmósfera de aire presentaba un contenido de  $7\alpha$  y  $7\beta$ -hidroxicolesterol entre 1.5 y 3 veces mayor que cuando se almacenaba en atmósfera de nitrógeno. Además, almacenando dichas muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un año se encontraron con cantidades significativas de epoxicolesterol y colestanetriol. Monahan et al. (42) demostraron que la velocidad de

oxidación del colesterol en carne de cerdo se aceleró durante el almacenamiento en refrigeración posterior al cocinado, especialmente durante las primeras 48 horas, siguiendo la misma tendencia que la oxidación lipídica general. Zanardi et al. (43) estudiando la eficacia de diversas condiciones de envasado sobre la formación de óxidos de colesterol en embutidos tipo Milano concluyeron que las atmósferas modificadas (100% N<sub>2</sub>) parecían ser más eficaces que el vacío en la protección de la oxidación del colesterol.

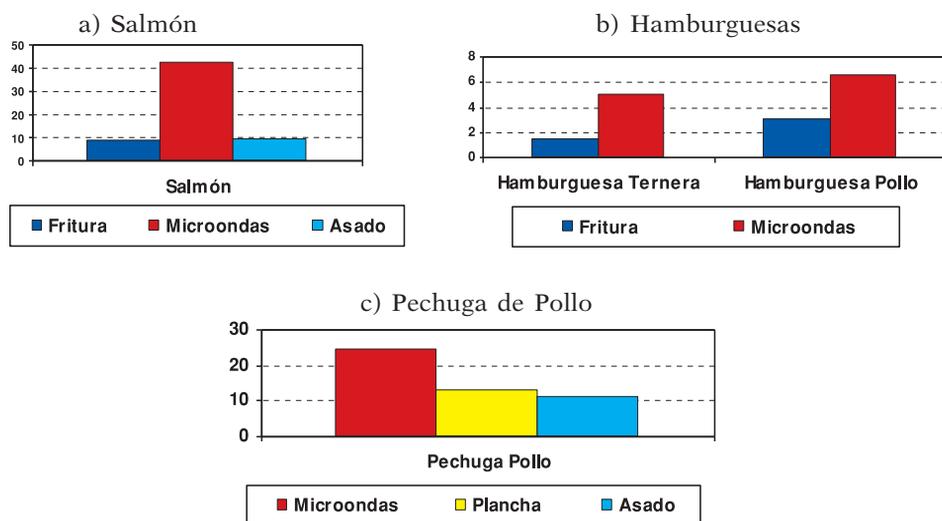


FIGURA 6. *Incremento (n veces) en el contenido en COPs para cada tipo de alimento con diferentes tecnologías culinarias.*

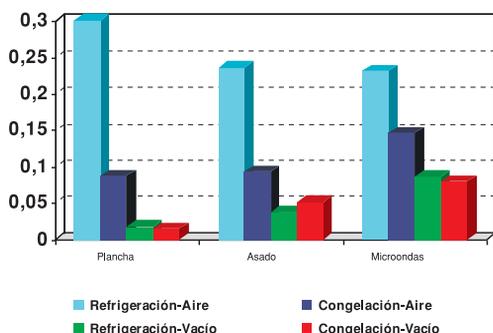


FIGURA 7. *Efecto del almacenamiento en distintas condiciones sobre la formación de óxidos de colesterol en pechugas de pollo (mg/100 g alimento).*

En nuestros trabajos se observó que el almacenamiento en condiciones de vacío de alimentos cocinados disminuye de forma drástica la formación de óxidos de colesterol. Asimismo, se ha podido observar que en condiciones normales de presencia de oxígeno la congelación resulta más eficaz que la refrigeración para inhibir la oxidación del colesterol. Efectivamente en la Figura 7 se puede observar que tanto en condiciones de aerobiosis como en condiciones de vacío el contenido de COPs es mayor en los alimentos mantenidos en refrigeración (4°C durante 4 días) que en los alimentos mantenidos en congelación (-18°C durante 3 meses). Estos resultados avalan la idoneidad de la congelación como método de conservación de alimentos cocinados, añadiendo a su estabilidad microbiológica una mayor seguridad por la ralentización de los procesos oxidativos que afectan al colesterol.

Estos resultados del almacenamiento se confirman con los encontrados cuando se analizaron langostinos refrigerados frente a langostinos congelados a nivel comercial. La congelación de estos últimos suele realizarse de forma inmediata a su captura por lo que se produce una eficaz inhibición de los procesos de deterioro microbiológico y químico-enzimático. De ahí que resulta razonable que los langostinos congelados presentasen menores concentraciones de óxidos de colesterol que los refrigerados, esos últimos comercializados como «frescos».

Diversos autores apuntan la necesidad de estimar las ingestas diarias de COPs, para lo que conviene tener en cuenta que los COPs no se ingieren independientemente a otros compuestos de oxidación lipídica que también se han relacionado con el desarrollo de aterosclerosis, y que hace falta disponer de la metodología apropiada para ello.

En la Tabla 1 se presentan las estimaciones de ingesta de óxidos de colesterol procedentes de raciones habituales aplicadas a los diferentes alimentos objeto de nuestros estudios. Obviamente no se han tenido en cuenta los alimentos en crudo ya que el consumo de todos ellos se realiza una vez cocinados.

TABLA 1. *Estimación de la ingesta de óxidos de colesterol por ración (mg COPs/ración).*

		<i>mg COP/ración</i>
<b>Fritura</b>	Salmón	0.090
	Hamburguesa Ternera	0.045
	Hamburguesa Pollo	0.154
	Lomo de cerdo	1.187
<b>Asado</b>	Salmón	0.094
	Pechuga Pollo	0.041
<b>Microondas</b>	Salmón	1.011
	Hamburguesa Ternera	0.152
	Hamburguesa Pollo	0.328
	Pechuga Pollo	0.091
	Salchichas	0.743
<b>Plancha</b>	Pechuga Pollo	0.049
	Langostinos frescos	0.115
	Langostinos congelados	0.034

Ración de carnes: 125 g; Ración de pescados: 150 g. (Muñoz et al., 2004).

Los alimentos que aportan mayores cantidades de COPs son el salmón cocinado a microondas (>1 mg/ración), seguido de las hamburguesas de pollo cocinadas al microondas (0.33 mg/ración), el salmón asado almacenado en condiciones de congelación (0.27 mg/ración), las hamburguesas de pollo cocinadas por fritura y las de ternera al microondas (0.15 mg/ración). La interpretación de estos resultados resulta difícil al no existir estudios que indiquen cuales pueden ser las cantidades de COPs ingeridas que puedan suponer un riesgo para la salud. Hay algún trabajo que señala como límite seguro < 0.1 mg/día, aunque esta referencia no está avalada por evidencias científicas. Otros autores señalan como peligrosos porcentajes de oxidación referidos al colesterol superiores al 0.5% (44). Esta cifra es solo superada por el salmón cocinado al microondas, con un valor de 0.80%.

## CONCLUSIÓN

En general, se puede considerar que los contenidos de COPs en los alimentos objeto de este trabajo se encuentran en valores que no suponen riesgo para la salud. Sin embargo, los demostrados efectos negativos de los óxidos de colesterol, junto con la evidencia científica de su formación en los alimentos y de su absorción a partir de los mismos, hace que sea necesario conocer y controlar la ingesta de este tipo de compuestos en la dieta habitual.

## REFERENCIAS

- (1) SMITH, L.L. (1981). Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York.
- (2) PANIANGVAIT, P.; KING, A.J.; JONES, A.D. Y GERMAN, B.G. (1995) Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* 60(6): 1159-1174.
- (3) TAI, C.Y.; CHEN Y.C. Y CHEN B.H. (1999) Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (part I). *J. Food Drug Analys*, 7(4): 243-257.
- (4) ZHOU, Q.; WASOWICZ, E.; HANDLER, B.; FLEISHER, L. Y KUMMEROV, F.A. (2000) An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 149: 191-197.
- (5) SCHROEPFER, G.J., JR. (2000) Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and others processes. *Physiol. Rev.* 80: 361-554.
- (6) GARCÍA-CRUISET, S.; CARPENTER, K.L.; GUARDIOLA, F.; STEIN, B.K. Y MITCHINSON, M.J. (2001) Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radical Res.* 53(1): 31-41.
- (7) MEYNIER, A.; ANDRE, A.; LHERMINIER, J.; GRANDGIRARD, A. Y DEMAISON L. (2005) Dietary oxysterols induce in vivo toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells. *Eur. J. Nutr.* 44: 393-405.
- (8) LARSSON, D.A.; BAIRD, S.; DIINGA INHALAM, J.; YUAN, X.M. Y LI, W. (2006) Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Rad. Biol. Med.* 41(6): 902-910.
- (9) ANSARI, G.A.S.; WALKER, R.D.; SMART, V.B. Y SMITH, L.L. (1982) Further investigations of mutagenic cholesterol preparations. *Food Chem. Toxicol.* 20: 35-41.
- (10) SMITH, L.L.; SMART, V.B. Y MADE-GOWDA, N.M. (1986) Mutagenic sterol hydroperoxides. *Mutat. Res.* 161: 39-48.
- (11) LEONARDUZZI, G.; SEVANI, A. Y POLI, G. (2001) Cholesterol oxidation products and fibrogenesis. *Biofactors* 15: 117-119.
- (12) LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Y MILLER, A.B. (2002) Plasma 7 $\beta$ -hydroxycholesterol as a possible predictor of lung cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 1630-1637.

- (13) SEVANI, A. Y PETERSON, A.R. (2002) The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol.* 24(10-11): 1103-1110.
- (14) GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; RAFECAS, M. Y BOATELLA, J. (1996) Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chem. Toxicol.* 34(2): 193-211.
- (15) BROWN, A.J. Y JESSUP, W. (1999) Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 142(1): 1-28.
- (16) DICZFALUSY, U. (2004) Analysis of cholesterol oxidation products in biological samples. *J. AOAC Int.* 87: 467-473.
- (17) LIZARD, G. (2006) Oxysterols mixtures, a promising approach to investigate the biological effects of oxysterols: a commentary on «Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects.» *Free Rad. Biol. Med.* 41: 872-873.
- (18) OSADA, K.; SASAKI, E. Y SUGANO, M. (1994) Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats. *Lipids.* 29: 555-559.
- (19) STAPRANS, I.; PAN, X.M.; RAPP, J.H.; GRUNFELD, C. Y FEINGOLD, K.R. (2000) Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor and apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 708-714.
- (20) ECHARTE, M.; ANSORENA, D. Y ASTIASARAN, I. (2001a) Fatty acid modifications and cholesterol oxidation in pork loin during frying at different temperatures. *J. Food Prot.* 64(7): 1062-1066.
- (21) ECHARTE, M.; ZULET, M. Y ASTIASARÁN, I. (2001b) Oxidation process affecting fatty acids and cholesterol in fried and roasted salmon. *J. Agric. Food. Chem.* 49(11): 5662-5667.
- (22) ECHARTE, M.; CONCHILLO, A.; ANSORENA, D. Y ASTIASARÁN, I. (2003a) Cholesterol oxidation products in fresh and frozen shrimps, raw and grilled. En: IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición. Puerto de la Cruz, Tenerife (Spain).
- (23) ECHARTE, M.; ANSORENA, D. Y ASTIASARAN, I. (2003b) Consequences of microwave heating and frying on the lipid fraction of chicken and beef patties. *J. Agric. Food Chem.* 51(20): 5941-5945.
- (24) CONCHILLO, A.; ANSORENA, D. Y ASTIASARAN, I. (2003) The combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on the lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *J. Food Prot.* 66(5): 840-846.
- (25) CONCHILLO, A.; ANSORENA, D. Y ASTIASARAN, I. (2005a) Intensity of lipid oxidation and COP formation during frozen storage of raw and cooked chicken. *J. Sci. Food Agric.* 85(1): 141-146.
- (26) CONCHILLO, A.; ANSORENA, D. Y ASTIASARAN, I. (2005b) Use of microwave in chicken breast and application of different storage conditions: consequences on oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* 221(5): 592-596.
- (27) CONCHILLO, A.; HOSTALIER, N.; ANSORENA, D. Y ASTIASARÁN, I. (2002) Formación de óxidos de colesterol en pechugas de pollo durante el almacenamiento en refrigeración con o sin vacío. En: V Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Madrid (Spain).

- (28) CONCHILLO, A.; ANSORENA, D. Y ASTIASARÁN, I. (2003) Efecto del envasado en atmósferas modificadas sobre la formación de óxidos de colesterol en pechugas de pollo asadas almacenadas en refrigeración y congelación. En: I Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología y Seguridad Alimentaria. Pamplona (Spain).
- (29) ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D., ZULET, M.A.; ECHARTE, M. Y CONCHILLO, A. (2006) Óxidos de colesterol en alimentos cocinados y conservados en diferentes condiciones. En: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Huelva (Spain).
- (30) ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D.; RUIZ, N.; MENÉNDEZ, M. Y VALENCIA, I. (2006) Formación de óxidos de colesterol en salchichas cocinadas a microondas. En: CIBSA. Sevilla (Spain).
- (31) Fat (crude) or ether extract in meat. 960.39. AOAC. (2002b). En: Official methods of analysis (17<sup>th</sup> ed.). Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists.
- (32) KOVACS, M.I.P.; ANDERSON, W.E. Y ACKMAN, R.G. (1979) A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. *J. Food Sci.* 44: 1299-1301, 1305.
- (33) FOLCH, J.; LEES, M. Y STANLEY, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- (34) GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P.B.; RAFECAS, M. Y BOATELLA, J. (1995) Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J. Chromatogr. A.* 705: 289-304.
- (35) MUÑOZ, M.; ARANCETA, J. Y GARCÍA-JALÓN I. (2004) Peso por unidad y raciones habituales de algunos alimentos. En: Nutrición Aplicada y Dietoterapia. Ed. Eunsa, 2<sup>a</sup> Ed., Pamplona (Spain).
- (36) TAI, C.Y.; CHEN Y.C. Y CHEN B.H. (2000) Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (part II). *J. Food Drug Analys.* 8(1): 1-15.
- (37) FINOCCHIARO, E.T.; LEE, K. Y RICHARDSON, T. (1984) Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butter oil. *JAOCS* 61: 877-883.
- (38) HUBBARD, R.; ONO, Y. Y SÁNCHEZ, A. (1989) Atherogenic effect of oxidized products of cholesterol. *Prog. Food Nutr. Sci.* 13: 17-44.
- (39) KUMAR, N. Y SINGHAL, O.P. (1991) Cholesterol oxides and atherosclerosis. *J. Sci. Food Agric.* 55: 497-510.
- (40) MORGAN, J.N. Y ARMSTRONG, D.J. (1992) Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *J. Food Sci.* 57: 43-45, 107.
- (41) SARANTINOS, J.; O'DEA, K. Y SINDAIR, A.J. (1993). Cholesterol oxides in Australian foods: Identification and quantification. *Food Australia*, 45: 485-490.
- (42) MONAHAN, F.J.; BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A.; LYNCH, P.B. Y GRAY, J.I. (1992) Influence of dietary fat and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Sci* 31: 229-241.

- (43) ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BADIANI, A. Y CHIZZOLINI, R. (2002) Lipid and colour stability of Milano-type sausages:effect of packing conditions. *Meat Sci.* 61: 7-14.
- (44) LERCKER, G. Y RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. (2000) Cholesterol Oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in Different Food Products. *J. Food Comp. Anal.* 13(4): 625-631.