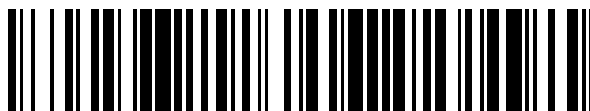


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 465**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.1995** **E 05011507 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014** **EP 1707572**

54 Título: **Composiciones de esteroides a partir de jabón de pulpa**

30 Prioridad:

29.09.1994 US 314945

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.06.2014

73 Titular/es:

PHARMACHEM LABORATORIES, INC. (100.0%)
265 Harrison Avenue
Kearny, New Jersey 07032-4315, US

72 Inventor/es:

NOVAK, EGON;
JONES, PETER J. y
KUTNEY, JAMES P.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 464 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de esteroides a partir de jabón de pulpa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la preparación y purificación de composiciones de esteroides a partir de jabón de pulpa, a las propias composiciones per se y al uso de estas composiciones y sus derivados como agentes para prevenir o tratar dislipidemias primarias y secundarias.

Antecedentes de la invención

10 La causa directa de la angina y el ataque cardíaco es un proceso degenerativo denominado aterosclerosis. La aterosclerosis es el resultado de una serie de factores ambientales y heredados (genéticos) integrados. La interacción de estos factores, de los cuales, en nuestra civilización, la dieta parece ser el más importante, conduce al desarrollo de la aterosclerosis. El crecimiento de placas ateroscleróticas con un relleno de colesterol corta, en último término, el suministro de sangre al músculo cardíaco o, como alternativa, al cerebro o a las piernas, dependiendo de la localización de la placa en el árbol arterial.

15 Uno de los principales factores de riesgo para la aterosclerosis que pueden modificarse potencialmente es el nivel de colesterol sanguíneo. Una serie de estudios bien documentados han demostrado que el nivel de colesterol sanguíneo en efecto es un importante factor predictivo para el riesgo de ataque cardíaco y también para el ictus. La relación entre la concentración sanguínea de colesterol y el riesgo de padecer estos trastornos es una gradación (cuanto mayor sea el nivel, más probable es la enfermedad) continua (abarca todos los niveles de colesterol), sin un umbral aparente (incluso disminuyendo los niveles considerados bajos, se puede disminuir aún más el riesgo de la enfermedad). Por ejemplo, en personas mayores de cuarenta años, un nivel de colesterol sanguíneo de 7,0 mmol/l presenta un riesgo de enfermedad de las arterias coronarias de tres a cuatro veces mayor que el asociado con unos niveles menores que 5,0 mmol/l. La relación se convierte en especialmente pronunciada cuando los niveles son mayores que 5,2 mmol/l. Por ejemplo, la tasa de mortalidad entre hombres con unos niveles de colesterol de 8,0 mmol/l es casi seis veces mayor que entre los hombres con niveles de 4,0 mmol/l. Estos descubrimientos más recientes son coherentes con estudios anteriores.

25 Otros grandes ensayos clínicos han demostrado claramente que disminuyendo los niveles altos de colesterol se puede reducir el riesgo de infarto de miocardio mortal y no mortal, angina, cambios en electrocardiogramas y en la cirugía de bypass de las arterias coronarias. El primero y más conocido de estos ensayos se realizó en Lipid Research Clinics, en el que los ensayos de prevención primaria coronaria demostraron que con cada reducción del 1% en el nivel de colesterol total sanguíneo se produce una reducción del 2% en el riesgo de enfermedad de las arterias coronarias.

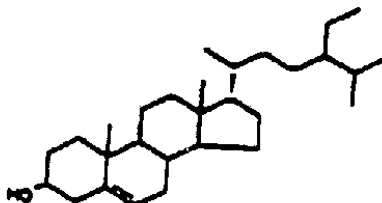
30 Para que cualquier terapia preventiva a largo plazo de la hipercolesterolemia tenga éxito, esta debe comenzar a una edad relativamente temprana y continuar indefinidamente. Aunque una dieta baja en grasas es la piedra angular de dicha terapia a largo plazo, hasta 60% de los pacientes la abandonan después de seis meses. La dificultad para seguir la dieta es muy alta en muchos países occidentales porque la dieta general es rica en grasas. Los malos perfiles de colesterol en muchos pacientes se exacerban por la frecuencia de otros factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular, tales como alta presión sanguínea, diabetes, obesidad y tabaquismo.

35 Las modificaciones en la dieta como terapia para la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares se ha refinado significativamente a lo largo de los últimos 10 a 15 años. En particular, los investigadores han reconocido que los esteroides vegetales (fitoesteroides) son eficaces para disminuir los niveles plasmáticos de colesterol (Lees *et al.*, *Atherosclerosis*, 28 (1977) 325-338; Kudehodkar *et al.*, *Atherosclerosis*, 23 (1976) 239; Day, *Artery*, 18(3):125-132 (1991)).

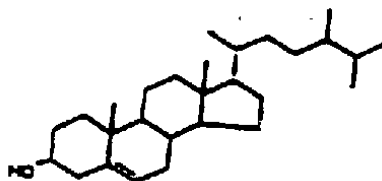
40 Los fitoesteroides son compuestos similares a esteroides sintetizados en plantas sin valor nutricional para los seres humanos. En las plantas son necesarios para la función celular, de una manera similar a la forma en que se necesita el colesterol en los seres humanos. La dieta occidental media contiene hasta 360 mg de fitoesteroides diarios. En fechas recientes, estos esteroides vegetales dietéticos han recibido mucha atención por sus posibles propiedades anticáncer y su capacidad para disminuir los niveles de colesterol cuando se proporcionan como alimento a una serie de especies de mamífero, que incluyen el ser humano.

45 Desde el punto de vista químico, los fitoesteroides se parecen mucho al colesterol en su estructura. Los principales fitoesteroides son el beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol. Otros incluyen el estigmasterol (beta-sitostanol), sitostanol, desmosterol, calinasterol, poriferasterol, clionasterol y brassicasterol. Las estructuras químicas del beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol son:

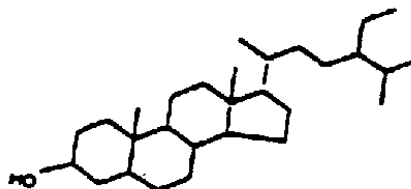
beta-sitosterol



campesterol



stigmasterol



El mecanismo mediante el cual los fitoesteros disminuyen el colesterol sanguíneo en animales no está claro, pero parece implicar la inhibición de la absorción del colesterol desde el yeyuno proximal compitiendo con el colesterol en sitios de captación específicos. Los datos de las investigaciones también sugieren que algunos fitoesteros no son absorbidos en el yeyuno proximal (sitostanol) y, cuando se produce una absorción (beta-sitosterol), es de cantidades muy limitadas.

Basándose en estos descubrimientos de las investigaciones, el uso de fitoesteros como suplemento dietético para reducir la absorción del colesterol se ha estudiado ampliamente (Lees *et al.*, *supra*; Pollak, *Pharmac. Ther.*, 31 (1985), 177-208; Raicht *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 388 (1975), 374-384).

En Lees *et al.*, *supra*, se realiza una comparación entre los efectos de preparaciones de sitosterol procedente de dos fuentes, esteroides de soja y esteroides de talloil, sobre el colesterol plasmático. Se descubrió que las preparaciones de esteroides vegetales son eficaces para tratar pacientes con hipercolesterolemia. Pollak, *supra*, es un artículo de investigación sobre los fitoesteros y su efecto sobre los lípidos séricos. Raicht, *supra*, describe más a fondo el efecto del beta-sitosterol sobre el equilibrio de los esteroides y las enzimas limitantes de la velocidad del metabolismo de los esteroides.

En general se acepta que los fitoesteros ofrecen una combinación exclusiva de seguridad a largo plazo, eficacia y versatilidad en el tratamiento de seres humanos. El desafío actual con respecto a los fitoesteros es su aislamiento y purificación a partir de fuentes vegetales, y la determinación de otras fuentes que sean baratas, utilizables a gran escala y que muestren efectos hipocolesterémicos.

Tradicionalmente, los fitoesteros se han aislado a partir de fuentes tales como aceite de maíz, aceite de germen de trigo, brea de soja y brea de aceite de maíz. De modo similar, se ha utilizado la brea de talloil, que se obtiene durante el proceso de la preparación de papel a partir de madera, en particular madera de pino, como fuente de fitoesteros. En general, en este proceso, las virutas de madera son digeridas con sosa cáustica para producir una pulpa o "jabón". El jabón después se destila para eliminar los materiales volátiles y queda una "brea" como residuo. Los investigadores han aislado fitoesteros a partir de esta brea.

Existen algunas desventajas notables con estas fuentes tradicionales de fitoesteros. La brea de talloil es un material extremadamente complejo que comprende resinas, ácidos grasos, productos de la oxidación, materiales esterificados y fitoesteros. Aunque la brea es barata, porque es el último residuo que queda de diversos procesos de fabricación, es muy difícil recuperar esteroides de alto peso molecular a partir de ella con buenos rendimientos y con las altas puridades requeridas para los usos farmacéuticos.

La patente de EEUU n.º 3.840.570 de Julian proporciona un proceso para preparar esteroides a partir de brea de talloil mediante extracción en una mezcla de agua-alcohol-hidrocarburo, seguido de una saponificación y una posterior

purificación. El material de partida en este proceso es la brea de talloil a partir de la cual se extraen los fitoesteres y diversas impurezas. Se reconoce que, en cualquier proceso de purificación de la brea de talloil, las impurezas de ácidos y alcoholes de cadena larga son particularmente difíciles de separar de los esteroides (que, en sí mismos, son alcoholes de alto peso molecular).

- 5 Oros investigadores han tratado la cuestión de la purificación de esteroides a partir de brea de talloil: patente de EEUU n.º 2.835.682, de Steiner y Fritz; patente de EEUU n.º 2.715.638, de Albrecht y Herrlinger; patente de EEUU n.º 2.573.891, de Christenson. Es importante advertir que en cada uno de estos procesos de purificación conocidos, el material de partida es brea de talloil que tiene los problemas de recuperación analizados anteriormente.

Un objeto de la presente invención es obviar o mitigar las anteriores desventajas.

10 Sumario de la invención

La presente descripción proporciona un proceso para purificar y preparar composiciones de fitoesteres a partir de jabón de pulpa, que comprende extraer del jabón de pulpa un precipitado cremoso y purificar este precipitado para formar una composición de fitoesteres exclusiva. De modo más específico, el precipitado cremoso se extrae a partir del jabón de pulpa utilizando un procedimiento de extracción con disolventes. La composición resultante después se purifica del precipitado cremoso mediante cristalización.

- 15 La presente invención también proporciona composiciones exclusivas que son eficaces para prevenir o tratar dislipidemias y que comprenden beta-sitosterol, campesterol y estigmastanol, según se describe en las reivindicaciones. Las composiciones de fitoesteres proporcionadas en la presente son significativamente diferentes de las que se encuentran en plantas, alimentos y aceites. En particular, el suministro de estigmastanol parece potenciar la eficacia. Estas composiciones también pueden comprender diversos compuestos concurrentes, que pueden o no ser fitoesteres. En particular, estos compuestos concurrentes pueden incluir triterpenos, alcoholes de cadena larga y otros compuestos orgánicos solubles en alcoholes.

- 20 La presente invención describe también el uso de las composiciones descritas en la presente para prevenir o tratar dislipidemias primarias y secundarias y aterosclerosis, incluyendo enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad vascular periférica e ictus en seres humanos y animales.

- 25 Las exclusivas composiciones de la presente invención han mostrado resultados excelentes para disminuir el colesterol sanguíneo total (TC) y de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además, y de forma bastante sorprendente, se ha descubierto que las composiciones de la presente invención, en diferentes especies animales, mantienen o elevan los niveles plasmáticos de colesterol sanguíneo de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Esta característica de la presente invención tienen una importancia crítica, debido al hecho de que las investigaciones han demostrado que, independientemente de los niveles de TC, a medida que disminuye el nivel de HDL plasmático, aumenta el riesgo de aterosclerosis. Los fitoesteres aislados a partir de brea de talloil, soja y otras fuentes no han mostrado, según el conocimiento de los presentes inventores, este exclusivo efecto sobre el HDL.

- 30 Aunque se conoce la producción de algunos tipos de fitoesteres a partir de la brea destilada del jabón de tratamientos de virutas de madera, hasta la fecha no se han producido composiciones de fitoesteres a partir del componente de jabón de pulpa del proceso de tratamiento de virutas de madera. La brea de talloil tiene una composición significativamente diferente de la del jabón de pulpa. Se cree que el sorprendente efecto de las composiciones de la presente invención es debido, al menos parcialmente, al uso del jabón de pulpa como material de partida y al exclusivo proceso de separación.

40 Breve referencia a los dibujos

Mediante los siguientes dibujos no limitantes se ilustrarán diversos aspectos de la invención, en los que:

la figura 1 es un perfil de cromatografía de gases para una composición (en lo sucesivo Forbes-2) dentro del alcance de la presente invención;

la figura 2 es una representación del perfil en la figura 1 de 35 a 45 minutos de tiempo de retención;

- 45 la figura 3 es una representación del perfil en la figura 1 de 22 a 27 minutos de tiempo de retención;

la figura 4 es un índice del perfil de cromatografía de gases de la figura 1;

la figura 5 es un perfil de cromatografía de gases para otra composición (en lo sucesivo Forbes-3) dentro del alcance de la presente invención;

la figura 6 es una representación del perfil en la figura 5 de 32 a 48 minutos de tiempo de retención;

- 50 la figura 7 es un índice del perfil de cromatografía de gases de la figura 5;

la figura 8 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de Forbes-1 y Forbes-2 sobre las concentraciones

de TC en ratas;

la figura 9 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de Forbes-1 y Forbes-2 sobre las concentraciones de colesterol-LDL en ratas;

5 la figura 10 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de Forbes-1 y Forbes-2 sobre las concentraciones de colesterol-HDL en ratas;

la figura 11 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de Forbes-3 sobre el TC sérico en hámsters;

la figura 12 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de Forbes-3 sobre el colesterol-LDL sérico en hámsters;

10 la figura 13 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de Forbes-3 sobre el colesterol-HDL sérico en hámsters;

la figura 14 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de diversos tratamientos dietéticos sobre los niveles de colesterol en hámsters macho y hembra;

la figura 15 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de diversos tratamientos dietéticos sobre los niveles de colesterol plasmático en hámsters macho;

15 la figura 16 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de diversos tratamientos dietéticos sobre los niveles de colesterol plasmático en hámsters hembra;

la figura 17 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de diversos tratamientos dietéticos sobre los niveles de triglicéridos plasmáticos en hámsters macho y hembra;

20 la figura 18 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de diversos tratamientos dietéticos sobre las proporciones de HDL/apo-B en hámsters macho y hembra;

la figura 19 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de los tratamientos dietéticos sobre el colesterol total en hámsters en un estudio de 45 días;

la figura 20 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de los tratamientos dietéticos sobre la correlación del colesterol con sitostanol;

25 la figura 21 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de los tratamientos dietéticos sobre los niveles de HDL en hámsters a lo largo de 45 días;

la figura 22 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de los tratamientos dietéticos sobre las proporciones de no-apoA/apoA en hámsters a lo largo de 45 días; y

30 la figura 23 representa una gráfica de barras que ilustra los efectos de los tratamientos dietéticos sobre los esteroides no-apoA en hámsters a lo largo de 45 días.

Realizaciones preferidas de la invención

El proceso de la presente invención comprende las etapas de:

(A) obtener o preparar el material de partida, un jabón de pulpa derivado de plantas;

(B) extraer del jabón un precipitado cremoso utilizando un disolvente apropiado; y

35 (C) purificar, a partir del precipitado cremoso, una composición de fitoesteroides.

Existen numerosas fuentes posibles del jabón de pulpa derivado de plantas. En general, en un proceso conocido (el proceso de "Kraft"), se tratan virutas de madera con sosa cáustica para producir un jabón. Las virutas de madera pueden derivarse de cualquier variedad de árbol de madera dura o madera blanda que incluye, pero no se limita a abeto, cedro, pino, picea, roble, cicuta y álamo. Lo más preferiblemente, las virutas se derivan de madera de cualquier variedad forestal europea o de la costa del Pacífico del noroeste americano.

40 En la fase de extracción, el jabón se mezcla con una disolución de cetona y agua. Se emplea un disolvente de hidrocarburo para extraer los esteroides. Esta etapa puede realizarse a unas temperaturas en general de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 150 °C, pero lo más preferiblemente de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 100 °C. Lo más preferiblemente, esta fase de extracción se continúa a lo largo de 15 a 24 horas. Es importante advertir que no se requiere ni se sugiere el uso de alcohol durante la fase de extracción. El proceso de extracción de la presente invención se realiza utilizando un disolvente de cetona-agua-hidrocarburo.

La cetona se selecciona del grupo que tiene la estructura general RCOR¹, en la que R y R¹ son grupos alquilo.

Preferiblemente, los grupos alquilo son grupos C₁-C₆. Lo más preferiblemente, la cetona es 2-propanona (acetona). El hidrocarburo puede seleccionarse del grupo que comprende todos los hidrocarburos C₅-C₁₀. Lo más preferiblemente, el hidrocarburo es hexano.

5 Tal como se muestra en la figura 1, el producto de la fase de extracción es un residuo o precipitado cremoso a partir del cual se purifica la composición de fitoesteres. Esta fase de purificación puede realizarse mediante cristalización, separación cromatográfica o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. Lo más preferiblemente, el precipitado cremoso se disuelve en alcohol, se enfría lentamente, después se filtra y se lava con alcohol frío. El residuo se seca, y el producto resultante es una composición de fitoesteres.

10 En una forma preferida, el alcohol utilizado en la fase de purificación se selecciona del grupo de estructuras generales R-CHOH, R-CH₂OH y RCOH, en las que R es un grupo alquilo C₁-C₄. Lo más preferiblemente, el alcohol es metanol. La fase de enfriamiento puede realizarse a unas temperaturas de 10 °C a 0 °C, lo más preferiblemente a 3 o 4 °C durante 24 horas.

Las composiciones de fitoesteres que resultan de los procesos descritos en la presente pueden incorporarse directamente en suplementos alimentarios y formulaciones de vitaminas.

15 Las composiciones de fitoesteres de la presente invención han demostrado una marcada capacidad para modificar lipoproteínas, incluso a concentraciones menores de fitoesteres que las que aparecen en las formulaciones conocidas. Sin embargo, más sorprendente ha resultado el efecto de estas composiciones para aumentar los niveles plasmáticos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), un efecto que hasta la fecha no ha sido asociado con ninguna otra composición de fitoesteres derivada de talloil. Se cree que este efecto exclusivo puede ser debido al
20 uso de jabones de pulpa como material de partida, o el suministro de estigmastanol como elemento de la composición.

25 Las composiciones de la presente invención comprenden la siguiente proporción de fitoesteres: beta-sitosterol (1); campesterol (0,2-0,4); y estigmastanol (0,2-0,5). Lo más preferiblemente, el campesterol y el estigmastanol juntos representan al menos 50% de la concentración total de beta-sitosterol. En una forma más preferida, las composiciones de la presente invención comprenden la siguiente proporción de fitoesteres, comparado con fitoesteres derivados de soja:

	Pureza aproximada (%)	Proporción de fitoesteres conocidos		
		b-sitosterol	campesterol	estigmastanol
Soja		1	0,640	0,005
Forbes-1	91,0	1	0,354	0,414
Forbes-2	77,0	1	0,330	0,203
Forbes-3	90,0	1	0,268	0,299

La composición y la pureza de otros dos extractos dentro del alcance de la presente invención son como sigue.

	Pureza aproximada (%)	Composición (%)		
		b-sitosterol	campesterol	estigmastanol
Forbes-4	99,0	62,6	16,6	23,2
Forbes-5	98,3	64,7	16,4	17,2

30 En todas las composiciones descritas en la presente puede haber otros compuestos que pueden o no ser fitoesteres. Por ejemplo, se ha descubierto que el campestanol, otro fitoesterol, puede estar presente en una cantidad relativamente pequeña. Además, pueden estar presentes alcoholes grasos de cadena lineal, tales como behenil (C22) y lignoceril alcohol (C24). Para determinar la naturaleza de estos compuestos concurrentes se han
35 realizado análisis de cromatografía líquida de gases en cada una de las composiciones más preferidas de la presente invención.

Las condiciones de realización de la cromatografía de gases para los fitoesteres fueron: temperatura inicial, 80 °C, que se mantuvo durante 1 minuto; ascensión hasta 120 °C a 20 °C por minuto, que se mantuvo durante 7 minutos; ascensión hasta 24 °C a 20 °C por minuto, que se mantuvo durante 15 minutos; y ascensión hasta 269 °C a 20 °C por minuto, que se mantuvo durante 25 minutos. Al final de cada ensayo, la temperatura ascendió hasta 320 °C y se

mantuvo durante un mínimo de 5 minutos. La temperatura de inyección fue de 300 °C y la temperatura del detector fue de 320 °C. El caudal de la columna fue de 1 ml por minuto y el caudal de la válvula de división fue de 4 ml por minuto. El caudal de la válvula de salida fue de 4,5 ml por minuto. El gas vehículo fue helio.

5 Los resultados del análisis de cromatografía líquida de gases para dos de las composiciones más preferidas de la presente invención se muestra en las figuras 1-7.

10 Con respecto a la composición Forbes-2, los esteroides conocidos aparecen en la región de 35-45 minutos en las figuras 1 y 2. El beta-sitosterol viene indicado en el pico 87, el campesterol viene indicado en el pico 81, y el estigmastanol viene indicado en el pico 84. Los picos 65, 66 y 77 en la figura 2 son compuestos concurrentes que pueden mostrar efectos hipocolesterolémicos. Sin embargo, es posible que estos compuestos concurrentes puedan tener un efecto sinérgico sobre las acciones de los fitoesteroides conocidos en las composiciones. De modo similar, en las figuras 5 y 6, el campesterol, el estigmastanol y el beta-sitosterol son representados por los picos 6, 7 y 8, respectivamente.

Otra composición preferida dentro del alcance de la presente invención comprende los siguientes componentes:

Campesterol	14,1%
Campestanol	3,5%
B-sitosterol	62,8%
Estigmastanol	16,9%

para una concentración total de fitoesteroides del 97,3%.

15 **Ejemplo 1: Extracción y purificación**

Se obtuvo un lote de 3 kg de jabón de pulpa de B.C. Chemicals Inc. Se preparó una mezcla de 3 l de acetona y 1,5 l de agua a la cual se añadió el jabón. La mezcla se extrajo de modo continuo con 4,5 l de hexano a 50 °C durante 24 horas utilizando un evaporador de 18 l. El producto de la extracción resultante después se secó sobre sulfato de sodio y se dejó evaporar. Esto produjo 460 g de residuo o precipitado cremoso.

20 El precipitado cremoso se calentó y se agitó utilizando una barra magnética y se añadieron lentamente 460 ml de metanol. La mezcla se sometió a reflujo con agitación durante 15 min, y se enfrió lentamente durante 3-5 horas. La mezcla se enfrió a 3-4 °C durante la noche y después se filtró y se lavó (dos veces) con 150 ml de metanol frío. Por último, la mezcla se mantuvo al vacío durante 2 días para producir 100 g de mezcla con una pureza del 82% (es decir, 82 g de fitoesteroides).

25 **Ejemplo 2: Evaluación de los efectos de las composiciones de fitoesteroides en ratas**

30 Se dividieron 90 ratas Wistar macho (80-100 g) en 3 módulos experimentales: composición Forbes-1; composición Forbes-2 y soja. Las treinta ratas dentro de cada módulo se volvieron a dividir en 5 regímenes dietéticos, según se indica en la tabla 2. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de luz inverso y se alimentaron durante 10 días con una dieta semipurificada basal (tabla 1), suplementada con diferentes cantidades de colesterol y fitoesteroides (tabla 2). Dentro de cada uno de los 5 grupos dietéticos, a 2 ratas se les administró la composición Forbes-1, a 2 ratas se les administró la composición Forbes-2, y a 2 ratas se les administraron fitoesteroides derivados de soja (Sigma).

Tabla 1. Composición de la dieta experimental

Ingredientes	%
Caseína	20
Almidón de maíz	21,5
Sacarosa	35
Aceite no volátil*	18
D1-metionina	0,5
Mezcla de minerales	4,00
Mezcla de vitaminas	1,00

*Mezcla de cártamo y manteca con una proporción 1:3.

Tabla 2. Regímenes dietéticos

Grupos	Esteroles añadidos a la dieta basal (%)	
	Colesterol	Fitoesteroles
1	0	0
2	1	0
3	1	0,2
4	1	0,5
5	1	1

5 Al final de periodo de alimentación, a las ratas se les inyectó por vía intraperitoneal óxido de deuterio (0,4 ml) y se les privó de alimento y agua durante al menos 2 horas. Después las ratas se anestesiaron con halotano. Se extrajeron muestras de sangre del corazón. Se retiraron con rapidez muestras del hígado, intestino delgado y músculo, se pesaron, se introdujeron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta la determinación de la síntesis de colesterol. Se determinó el colesterol total, el colesterol-LDL y -HDL con un kit comercial (Biopacific Diagnostic Inc.).

10 Los resultados de los efectos de las composiciones de fitoesteroles sobre el colesterol total, el colesterol-LDL y -HDL se representan en las figuras 8, 9 y 10, respectivamente. La eficacia de Forbes-1 y Forbes-2 resulta evidente por la reducción en el colesterol-LDL mostrada en la figura 9 y el aumento en el colesterol-HDL mostrado en la figura 10, en particular por Forbes-1. En la figura 8, la adición de colesterol (grupo dietético 2) a la dieta base (grupo 1) produjo un aumento en las concentraciones de colesterol en la circulación. La adición progresiva de niveles crecientes de fitoesteroles (grupos 3-5) dio como resultado una normalización de los niveles de colesterol en los grupos que recibieron Forbes-2 y Forbes-1, pero no fitoesteroles de soja, según se determina mediante un análisis de regresión.

15 La figura 9 demuestra que los fitoesteroles de Forbes-2 y Forbes-2 poseen mejor eficacia para disminuir el colesterol que los fitoesteroles de soja para el LDL. La figura 10 demuestra la mayor capacidad para aumentar el HDL de las composiciones preferidas de la presente invención, en particular Forbes-1, comparado con los fitoesteroles de soja.

Ejemplo 3: Evaluación de los efectos de las composiciones de fitoesteroles en hámsters

20 El presente estudio se realizó para estudiar el efecto de las composiciones de fitoesteroles dietéticos de la presente invención sobre el aumento inducido por el colesterol dietético de las concentraciones séricas de colesterol en hámsters.

25 Un total de 40 hámsters macho (80-100 g), alojados individualmente en jaulas de malla de acero inoxidable, se alimentaron con pienso para roedores y se aclimataron durante tres días en una sala con condiciones ambientales (20-22 °C, con iluminación de 17:00-05:00 h). Después los hámsters se dividieron en cinco grupos de 8 animales por grupo y se alimentaron durante 34 días con una dieta semipurificada basal (tabla 3) suplementada con diferentes cantidades de colesterol y una de las composiciones de fitoesteroles de la presente invención (Forbes-3) (tabla 4).

Tabla 3. Composición de la dieta experimental

Ingredientes	%
Caseína	20
Almidón de maíz	28
Sacarosa	36,3
Aceite de maíz	5,0
Celulosa	5,0
D1-metionina	0,5
Mezcla de minerales	4,00
Mezcla de vitaminas	1,00
Bitartrato de colina	0,2

Colesterol

0,025, 0,25

Tabla 4. Regímenes dietéticos

Grupos	Colesterol añadido a la dieta control (%)	Fitoesteroles añadidos a la dieta control (%)
1	0,025	ninguno
2	0,25	ninguno
3	0,25	0,25
4	0,25	0,5
5	0,25	1,0

Al final de periodo de alimentación, a los animales se les inyectó por vía intraperitoneal óxido de deuterio (0,4 ml) y se les privó de alimento y agua durante al menos 2 horas. Después los hámsters se anestesiaron con halotano. Se extrajeron muestras de sangre del corazón. Se retiraron con rapidez otras muestras de tejidos, que incluyen hígado, intestino delgado y músculo, se pesaron, se introdujeron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta la determinación de la síntesis de colesterol. Se determinó el colesterol total, el colesterol-LDL y -HDL con un kit comercial. Los resultados se evaluaron de modo estadístico con un análisis ONEWAY del procedimiento de varianza (SYSTAT).

Los hámsters alimentados con la dieta con alto contenido en colesterol presentaban un colesterol total y colesterol-LDL sérico significativamente mayor que los alimentados con la dieta con un contenido normal en colesterol (al 0,025%). El suplemento de fitoesteroles a niveles del 0,5% y 1% suprimió notablemente estos aumentos inducidos por el consumo de un nivel alto de colesterol (figuras 11 y 12). La concentración de colesterol-LDL en el grupo 5 fue menor, comparado con los niveles en hámsters alimentados con dietas normales que contienen colesterol (figura 12). Además, se produjo una asociación de regresión negativa del colesterol total y el colesterol-LDL con el nivel de fitoesteroles añadidos en la dieta (figura 13).

El suplemento de fitoesteroles provocó un ligero aumento en HDL, pero sin que supusiese una diferencia significativa (figura 13).

Ejemplo 4: Evaluación de los efectos de las composiciones de fitoesteroles en hámsters - ensayo de 90 días

Seis grupos de 20 hámsters (10 machos, 10 hembras) se alimentaron con dietas semipurificadas que contenían grasa al 30% (proporción de grasas poliinsaturadas/saturadas = 0,3) durante 90 días. La dieta 1 no contenía colesterol. Las dietas 2-6 contenían colesterol dietético al 0,25% (en p/p). Las dietas 3 y 4 contenían fitoesteroles de Forbes (con una pureza mayor que 90%) al 0,5% y al 1%, respectivamente. Las dietas fueron preparadas a partir de los ingredientes primarios cada semana. Los niveles de grasas, fitoesteroles y colesterol fueron determinados mediante una cromatografía líquida de gases. Todos los animales pudieron acceder sin restricciones al agua y a las dietas durante el periodo experimental. Los animales se pesaron cada semana. También se determinó la ingesta de alimento a diario y se promedió por semana pesando las cubetas de comida antes y después de cada periodo de alimentación de 24 h. Después de 90 días de alimentación, los animales se sacrificaron utilizando halotano y se recogió sangre para los análisis del perfil de lipoproteínas. Se determinaron los niveles en la circulación de triglicéridos y de colesterol total, colesterol-HDL y de partículas de colesterol que contienen apoB. Además, justo antes del sacrificio, se determinaron las tasas de síntesis y absorción de colesterol utilizando métodos que miden la desaparición del ¹⁴C-colesterol del intestino y la incorporación de deuterio al colesterol tisular, respectivamente. También se estudió la captación de fitoesteroles en el intestino y otros tejidos. Además, se conservaron muestras del intestino y del hígado para su envío a Bio-Research Laboratories de Senneville, Quebec, para los análisis histopatológicos, de carcinogenicidad y de función enzimática.

Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 14-18. Los grupos en estas figuras a menudo se indican mediante números, que se corresponden con los descritos en el diseño experimental. Las letras sobre las barras en las gráficas de barras identifican las diferencias significativas entre grupos. Cuando se indican letras, las barras que comparten la misma letra no son significativamente diferentes, mientras que las que tienen letras diferentes son diferentes a un nivel estadístico de $p < 0,05$.

En las figuras 14-16 se muestran los datos de colesterol en la circulación para hámsters macho y hembra que consumieron las dietas de ensayo durante 90 días. Se observaron efectos significativos del sexo en los niveles de colesterol total en la circulación para los animales que consumieron la dieta 2, la dieta base solo con colesterol

añadido, y la dieta 5 que contiene colesterol + fitoesteroles de soja. Las hembras, aunque no se diferencian de los machos en los niveles de colesterol en la dieta basal (grupo 1), mostraron una mayor respuesta al colesterol añadido solo, comparado con los machos. La adición de fitoesteroles niega esta diferencia, con la excepción del grupo 5.

5 Los datos del nivel de colesterol desglosados por sexos se muestran en las figuras 15 y 16. Para los machos (figura 15), la adición de colesterol solo a la dieta basal produjo un aumento significativo en el nivel de colesterol total en la circulación. La adición de fitoesteroles de Forbes al 0,5% dio como resultado la aparición de una tendencia hacia una disminución en el nivel de colesterol; sin embargo, la adición de fitoesteroles de Forbes al 1% indujo una reducción estadísticamente significativa en el colesterol, hasta aproximadamente los mismos niveles que el grupo control sin colesterol añadido. Cuando se añaden fitoesteroles de soja a la dieta al 0,5% o al 1% no se produce una
10 disminución significativa en el nivel de colesterol total en la circulación en los machos. Para el HDL, se observa un efecto diferencial de Forbes frente a soja, en el que la alimentación con Forbes no produce cambios en los niveles de HDL del grupo que recibe solo colesterol (grupo 2), pero la alimentación con soja produjo una disminución significativa en los valores de HDL en ambos niveles ensayados (grupos 5 y 6). No se produjeron diferencias significativas en las partículas de colesterol que contienen apoB, aunque aparece una tendencia hacia unos niveles
15 menores con la alimentación de colesterol y Forbes al 1%, comparado con los otros grupos.

Los datos para las hembras se muestran en la figura 16. Para el colesterol total y HDL se observa una influencia pronunciada de la adición de colesterol dietético solo. La adición de cualquiera de las fuentes de fitoesterol al 1% produce disminuciones significativas y similares en las concentraciones de colesterol total y HDL. Los niveles de partículas que contienen apoB no se ven influidos por la dieta.

20 Los niveles de triglicéridos en la circulación en hámsters que consumen las dietas de ensayo durante 90 días se muestran en la figura 17. Se produce un aumento en los niveles de triglicéridos en la circulación en animales hembra que reciben la dieta basal con colesterol y Forbes al 0,5%, comparado con la dieta basal sola, pero no se observan otras diferencias intergrupales en ninguno de los sexos. En los machos no se produjo ningún efecto o tendencia de la dieta sobre las concentraciones de triglicéridos.

25 En resumen, la clasificación de los resultados de los machos con las dietas de ensayo es la siguiente:

Tabla 5

	Colesterol total	LDL	HDL
Forbes al 0,5%	4	2	1
Forbes al 1,0%	1	1	2
Soja al 0,5%	2	3-4	4
Soja al 1,0%	3	4-3	3

La ventaja de las composiciones Forbes (las de la presente invención) puede observarse claramente. Además, se obtuvieron clasificaciones similares para la proporción de HDL:apoB en machos (figura 18):

Forbes al 0,5%	2
Forbes al 1,0%	1
Soja al 0,5%	4
Soja al 1,0%	3

30

También se descubrió que la proporción de HDL:LDL para las composiciones Forbes era de casi el doble que las que solo tienen β -sitosterol.

Ejemplo 5: Efectos de una composición de fitoesteroles sobre conejos

35 En este estudio se evaluaron dos conejos a lo largo de 43 días con respecto a los efectos de una de las composiciones de la presente invención (Forbes al 1% en la dieta) sobre sus perfiles de colesterol total. Los resultados son los siguientes:

Tabla 6. Perfiles de colesterol total en conejos (mg/dl)

Fecha	Conejo A	Conejo B
14/06/95	95	215
18/06/95	129	162
26/06/95	-	comienzo de la alimentación con Forbes al 1%
07/07/95	75	106
09/07/95	-	comienzo de la alimentación con Forbes al 1%
18/07/95	90	112
25/07/95	82	118
01/08/95	95	119
08/08/95	76	114

Puede observarse una disminución en el colesterol total en los conejos A y B durante las dos semanas de administración de la composición de fitoesteroles (Forbes al 1%). Este efecto continúa incluso después de dejar de administrar Forbes al 1%. Los efectos de las composiciones de la presente invención sobre la disminución del colesterol total persisten más allá de la fase de administración inicial.

Ejemplo 6: Efectos de la composición de fitoesteroles en ratones deficientes en Apo-E

Animales: Se adquirieron 19 ratones deficientes en Apo-E macho de 5 semanas en Jackson Laboratory, EEUU. Los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos, 9 animales en el grupo control y 10 ratones en el grupo de Forbes experimental. Después de 5 días como periodo de adaptación, los ratones se sangraron desde la cola hacia tubos capilares y se separó el plasma mediante la centrifugación de la sangre. Se calcularon los lípidos plasmáticos de los ratones.

Dieta: Se adquirió pienso para ratones con bajo contenido en colesterol y grasas en Jamieson's Pet Food Distributors Ltd., Vancouver, B.C. Se extrajeron los fitoesteroles derivados de talloil a partir de jabón de talloil utilizando el proceso descrito en la presente invención. Se evaluó la pureza y el porcentaje de cada fitoesterol individual en la mezcla del producto final mediante una cromatografía líquida de gases. El producto final muestra hasta 95% de pureza y contiene 69% de sitosterol, 15% de campesterol y 16% de estigmastenol. El pienso para ratones se trituró hasta alcanzar un estado de polvo fino. A este polvo se le añadió colesterol al 0,15% (en p/p) (Sigma) y se mezcló bien. Se volvió a granular una porción de esta dieta suplementada con colesterol, se secó y se utilizó para alimentar al grupo control de ratones, y otra porción se suplementó con fitoesteroles extraídos de talloil al 2% (en p/p), se volvió a granular, y se secó y se empleó para alimentar al grupo experimental de ratones.

Ensayos bioquímicos: Se midieron los triglicéridos y el colesterol total plasmático utilizando un kit enzimático (Boehringer Mannheim) y se calculó el colesterol-HDL mediante un método de precipitación previamente publicado utilizando polietilenglicol 6000.

Peso corporal y consumo de alimento: El peso corporal y el consumo de alimento de los ratones se midió cada semana.

Tabla 7. Media del peso corporal de los ratones (g) (solo se indican las mediciones mensuales)

Fecha	Grupo de Forbes	Grupo control
20/06/95	21,42	21,02
24/07/95	29,82	28,00
22/08/95	32,12	29,73
12/09/95	34,16*	30,78

* p<0,05

Tabla 8. Media del consumo semanal de alimento (g) (solo se indican las mediciones mensuales)

Fecha	Grupo de Forbes	Grupo control
26/06-03/07/95	19,61	21,21
01/08-08/08/95	32,62*	29,20
15/08-22/08/95	29,32	27,10
05/09-12/09/95	35,56	30,25

* p<0,05

Otros descubrimientos: No se observaron efectos secundarios con respecto a las nuevas dietas. Todos los animales de ambos grupos parecían normales, con unos hábitos normales, incluyendo los hábitos de evacuación. Un ratón en el grupo control fue encontrado muerto el 11/07/95. Puesto que no se guardó el cuerpo del ratón, no se realizó la autopsia. Otro ratón del grupo de Forbes fue encontrado deshidratado con pérdida de peso corporal. El animal se sacrificó y se descubrió que la razón de su enfermedad fue una maloclusión (crecimiento excesivo de los dientes).

Análisis estadísticos: Los resultados se analizaron utilizando el ensayo de la t de dos muestras suponiendo unas varianzas iguales.

Resultados

Los resultados hasta este momento se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 9. Media del nivel de colesterol total plasmático en ratones (mg/dl)

Fecha	Grupo de Forbes	Grupo control
20/06/95	606,28	599,61
18/07/95	1027,96*	1622,56
06/09/95	1168,57*	1508,63

* p<0,0001

Tabla 10. Media del nivel de triglicéridos plasmáticos en ratones (mg/dl)

Fecha	Grupo de Forbes	Grupo control
20/06/95	110,97	120,31
18/07/95	210,17	143,71
06/09/95	224,48	152,25

Tabla 11. Media del nivel de colesterol-HDL en ratones (mg/dl)

Fecha	Grupo de Forbes (9)	Grupo control (7)
08/07/95	42,00*	18,29

* p<0,001

A partir de los resultados puede observarse que el grupo de la composición Forbes muestra una disminución significativa (33%) en el colesterol total, un aumento insignificante en los triglicéridos, y un aumento significativo en el colesterol-HDL (>100%).

Ejemplo 7: Efecto de una composición de fitoesteroles sobre hámsters - ensayo de 45 días

Cincuenta hámsters GS se alojaron durante dos semanas en una instalación de cuidados animales antes de empezar a alimentarlos con una dieta semipurificada durante 45 días. Se dividieron en cinco grupos que se alimentaron con colesterol al 0,25%, junto con una de cuatro mezclas de esteroides vegetales: soja, talloil, sitostanol puro, y una mezcla artificial que representa a los fitoesteroides de talloil. El grupo control recibió solo colesterol al 0,25%. Su ingesta de alimentos se controló durante el periodo de estudio cada tres días. Se midió su peso corporal cada semana y en el momento de la recolección de los tejidos. Tres días antes de sacrificar a los hámsters GS,

estos se anestesiaron ligeramente con éter dietílico y recibieron una inyección intravenosa a través de la vena yugular de 0,4 ml de Intralipid que contenía 0,18 mg de ^{13}C -colesterol. Directamente después de la inyección, los animales fueron alimentados con sonda oral con 0,6 ml de una mezcla de lípidos (aceites de coco, oliva y cártamo) que contenía 0,44 mg de ^{18}C -colesterol. Después, los hámsters GS se mantuvieron en sus jaulas de alambre durante 72 horas, y se les suministró agua y alimento sin límite.

En el día del sacrificio, cada hámster GS recibió una inyección intraperitoneal de 1 ml de agua deuterada y se dejó que pasara una hora antes del sacrificio. Los animales se anestesiaron con éter dietílico y se recogieron muestras de sangre mediante cardiopunción. Se recogió el hígado, la vesícula biliar, el intestino delgado, el intestino grueso, y el corazón, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron en la nevera a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sus cadáveres y heces se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el posterior análisis de esteroides y lípidos totales.

Mediciones del peso del hígado, corporal y de la ingesta de alimentos

Se midió la ingesta de alimentos de los hámsters GS cada tres días. El análisis estadístico no mostró una diferencia significativa entre los cinco grupos en su consumo de alimentos. La media de la ingesta diaria en los cinco grupos varía de 8,84 a 9,34 g diarios, valor de $p = 0,4$. Los animales mostraron un significativo aumento en su peso corporal de aproximadamente 25 a 40 g durante el periodo de estudio, valor de $p < 0,05$ (ensayo de la t apareado). Las mediciones finales de su peso corporal variaron de 112,5 a 154,3 g. No se observó significancia estadística entre los diferentes grupos de tratamiento, valor de $p = 0,43$.

El peso del hígado varió significativamente entre las diferentes divisiones. El grupo tratado con sitostanol mostró el peso del hígado menor, comparado con el grupo control y otros grupos alimentados con colesterol al 0,25% y diferentes fitoesteroides, respectivamente. Además, el grupo tratado con soja presentó una diferencia significativa similar con el tratado con sitostanol cuando los datos se analizan estadísticamente utilizando el ensayo de Newman-Keuls. En general, todos los grupos que se alimentaron con esteroides vegetales mostraron un peso del hígado menor, comparado con el control alimentado con colesterol al 0,25%, valor de $p = 0,01$. Los hámsters GS alimentados con esteroides de talloil y sitostanol presentaron un peso medio del hígado del 15% y 20% menor que el del control, respectivamente. El talloil natural y el talloil preparado de modo artificial mostraron unos valores similares de los pesos del hígado, lo cual sugiere que el compuesto que falta en los esteroides de soja, el sitostanol, desempeña un papel principal en la disminución del contenido en esteroles del hígado.

Análisis de los lípidos

I. Colesterol total

Se determinaron los valores de colesterol total utilizando kits de reactivos enzimáticos comerciales en un analizador automático VP. Las muestras de sangre se midieron dos veces, y se empleó la media de los dos valores en el análisis estadístico final. Se emplearon métodos de ANOVA de una vía, con Newman-Keuls, y Bonferroni para los diferentes análisis de lípidos. El sitostanol disminuye significativamente el nivel de colesterol total en el plasma de hámsters GS en 34%, comparado con el control. El valor medio para el grupo control fue de 226,9 mg/dl, y el del grupo tratado con sitostanol fue de 151,2 mg/dl, valor de $p = 0,007$. Los fitoesteroides de talloil y las mezclas de talloil artificial mostraron una disminución similar en el colesterol plasmático (17,5%), 118,4 mg/dl y 186,1 mg/dl, respectivamente. Sin embargo, los fitoesteroides de talloil (Forbes) mostraron una disminución significativa en el valor de colesterol total (175,2 mg/dl) cuando una valor de la muestra fuera de escala se excluye del análisis, valor de $p < 0,02$ en el grupo de talloil, comparado con el grupo control (solo colesterol al 0,25%). La correlación entre la presencia de sitostanol y el menor nivel plasmático es significativo, valor de $p < 0,0001$, y $r = 0,46$.

II. Colesterol-HDL

La porción de apoA de las lipoproteínas presentes en el colesterol-HDL no mostró cambios significativos en sus valores entre los cinco grupos diferentes, valor de $p = 0,18$. Se observó una disminución no significativa del 15% en la media del valor de HDL en el grupo tratado con sitostanol. No obstante, este elemento no afecta a la disminución significativa en el colesterol total, que es del 34%. La proporción de lipoproteínas no-apoA a lipoproteínas apoA (HDL) no varía significativamente entre los grupos. El efecto confuso de los menores valores de HDL no significativos en los grupos de sitostanol y de talloil contribuye a crear un resultado no significativo en los valores de no-apoA/apoA (HDL). En general, los diferentes tipos de fitoesteroides no varían el nivel de colesterol-HDL en el plasma de hámsters GS.

III. LDL y/o esteroides no-apoA

El sitostanol es eficaz para disminuir los esteroides no-apoA en el plasma. Se demuestra una disminución del 55% en las lipoproteínas no-apoA, valor de $p = 0,02$. De forma similar a su efecto sobre el colesterol total, el talloil y la mezcla de talloil artificial disminuyen los esteroides no-apoA en 21%, respectivamente, lo cual sugiere de nuevo que existe una fuerte correlación entre el contenido en sitostanol en los fitoesteroides y sus efectos beneficiosos para disminuir los niveles de colesterol en el plasma de hámsters GS. Sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa debido a la variabilidad en los valores de los triglicéridos.

IV. Triglicéridos

- 5 Cuando se aplica el método de ANOVA de una vía a los valores de TG, estos no aprueban el ensayo de la normalidad. Los hámsters GS se sacrificaron en una condición de no ayuno (un estado importante para los futuros análisis de síntesis de colesterol, cinética, y absorción). Debido a esta situación, los diferentes valores estaban fuera de la escala. Con ANOVA y los rangos, los niveles de TG no mostraron una diferencia estadística entre los grupos. Los esteroides vegetales no afectaron a los niveles de TG plasmáticos en los hámsters GS.

Tabla 12. Rango de potencia

	Colesterol total	HDL	LDL	TG
Control	C	C	C	C
β -sitostanol de soja	4	1	3-4	1-4
Talloil (Forbes)	2-3	2-2	2-3	1-4
Sigmastanol	1	4	1	1-4
Talloil artificial	3-2	3-2	4-3-2	1-4

- 10 En conclusión, la composición derivada de jabón de talloil de la presente invención muestra el perfil más favorable debido al aumento en el colesterol-HDL y la disminución en el colesterol total. Este efecto de HDL no se observa en la composición de talloil artificial. De modo similar, el efecto global del sitostanol no es favorable debido a la significativa disminución en HDL.

- 15 Aunque no está completamente claro, parece que, con respecto a los esteroides vegetales, los esteroides relativamente hidrófobos inhiben más la absorción del colesterol total, mientras que los esteroides relativamente hidrófilos influyen más sobre el nivel de HDL. Las composiciones de fitoesteroides de la presente invención son exclusivas porque conservan ambos efectos.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición, que es un suplemento alimentario o una formulación de vitaminas, que comprende una composición de fitoesteros que comprende una cantidad eficaz para disminuir el LDL de estigmastanol, campesterol y β -sitosterol, en la que la proporción de beta-sitosterol es de 1,0, la proporción de campesterol es de entre 0,2 y 0,4, y la proporción de estigmastanol es de entre 0,2 y 0,5.
- 2.- La composición de la reivindicación 1, que es un suplemento alimentario.
- 3.- La composición de la reivindicación 1, que es una formulación de vitaminas.
- 4.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proporción de beta-sitosterol es de 1,0, la proporción de campesterol es de 0,354, y la proporción de estigmastanol es de 0,414.
- 10 5.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proporción de beta-sitosterol es de 1,0, la proporción de campesterol es de 0,330, y la proporción de estigmastanol es de 0,203.
- 6.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proporción de beta-sitosterol es de 1,0, la proporción de campesterol es de 0,268 , y la proporción de estigmastanol es de 0,299.

FIG 1

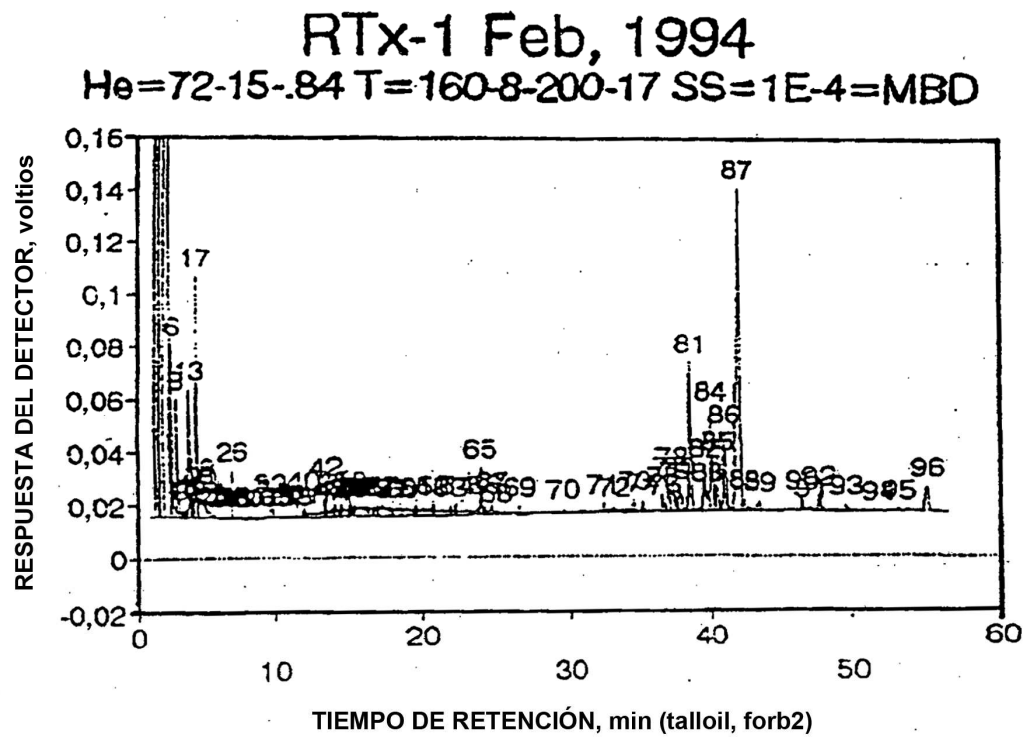


FIG 2

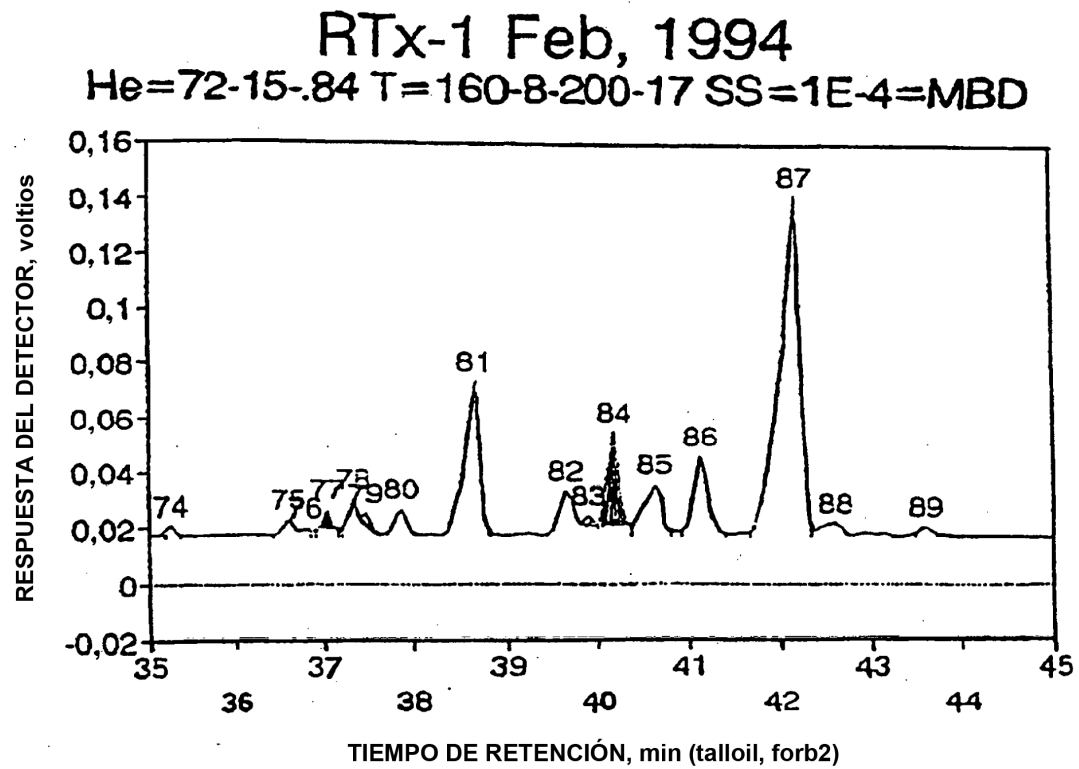


FIG 3

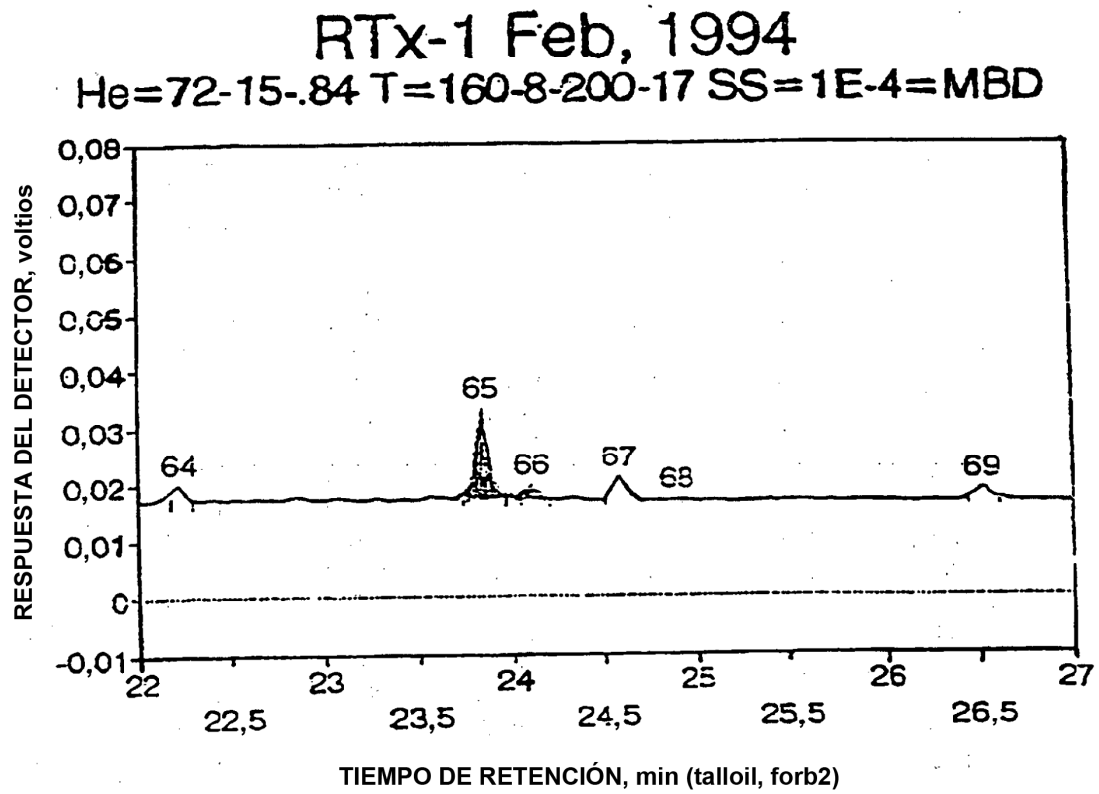


FIG. 4

FORBES-2

Índice	Tiempo min.	Área, V*5	Área, %	Línea de base, V	Altura, V	Verdadero, %
73	34,65	0,039	0,051	0,016	0,005	0,890674
74	35,267	0,029	0,037	0,016	0,004	0,646175
75	36,629	0,087	0,114	0,017	0,007	1,990919
76	36,808	0,004	0,005	0,019	0,001	0,087321
77	37,054	0,093	0,121	0,017	0,011	2,113168
78	37,354	0,16	0,208	0,017	0,014	3,632553
79	37,492	0,018	0,024	0,022	0,003	0,419141
80	37,879	0,094	0,123	0,017	0,01	2,148096
81	38,688	0,615	0,798	0,017	0,057	13,93643
82	39,675	0,24	0,311	0,017	0,017	5,431366
83	39,908	0,021	0,027	0,021	0,003	0,471533
84	40,208	0,377	0,49	0,017	0,039	8,557457
85	40,675	0,269	0,35	0,017	0,02	6,112469
86	41,154	0,33	0,428	0,017	0,03	7,474677
87	42,229	1,862	2,416	0,017	0,124	42,1935
88	42,625	0,088	0,114	0,017	0,005	1,990919
89	43,646	0,039	0,05	0,017	0,004	0,87321
90	46,742	0,045	0,059	0,017	0,004	1,030388

FIG 5

Análisis composicional mediante GLC de Forbes3

Material Forb 3 (mayo 94)

He-72-15-.84 T-160-8-200-17 SS-1E-4-MBD

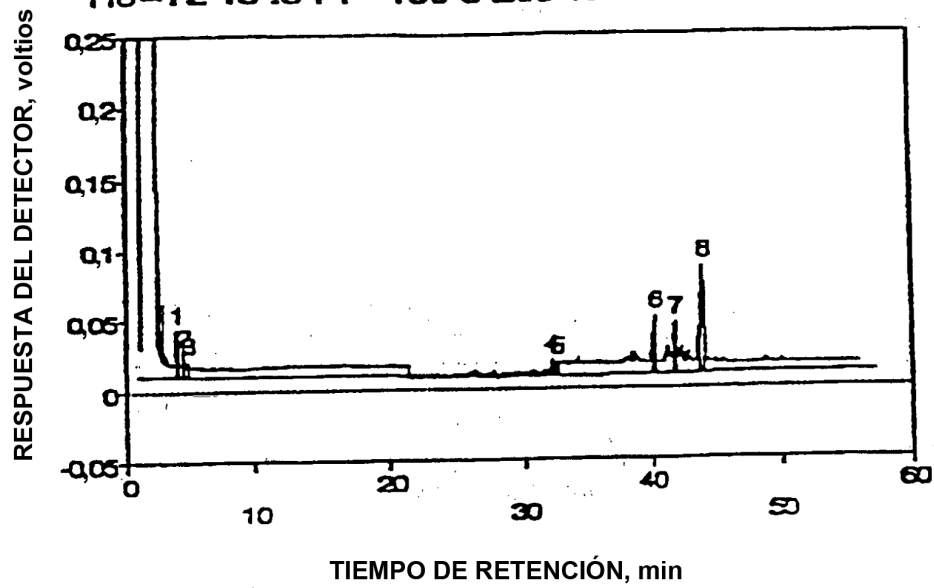


FIG 6

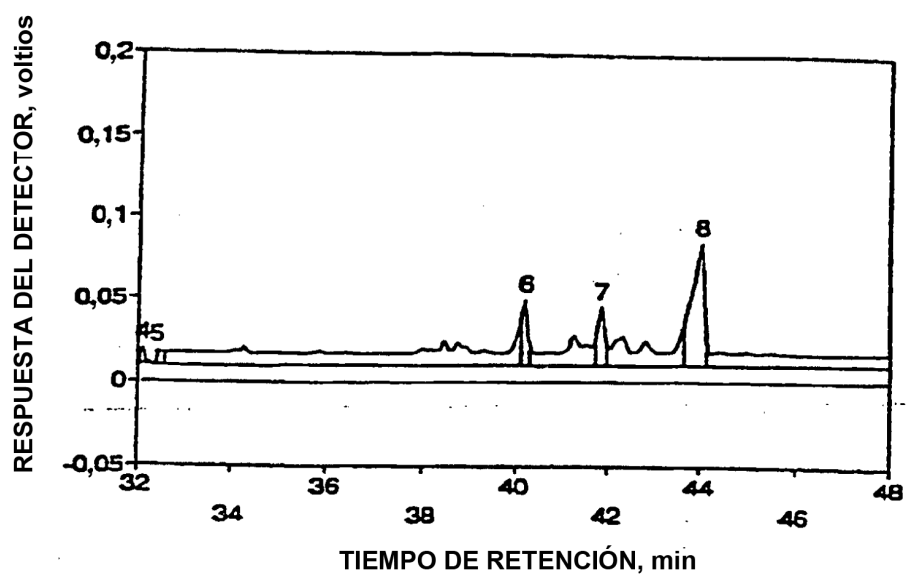


FIG. 7

Índice	Tiempo min.	Área, V*5	Área, %	Línea de base, V	Altura, V
1	4,012	0,078	3,224	0,011	0,033
2	4,486	0,161	6,649	0,011	0,017
3	4,775	0,007	0,269	0,018	0,004
4	32,117	0,05	2,077	0,009	0,011
5	32,433	0,083	3,858	0,009	0,009
6	40,217	0,347	14,328	0,01	0,041
7	41,879	0,389	16,084	0,01	0,038
8	44,058	1,297	53,532	0,01	0,074

FIG 8

Efecto de los fitoesteroides sobre el colesterol total

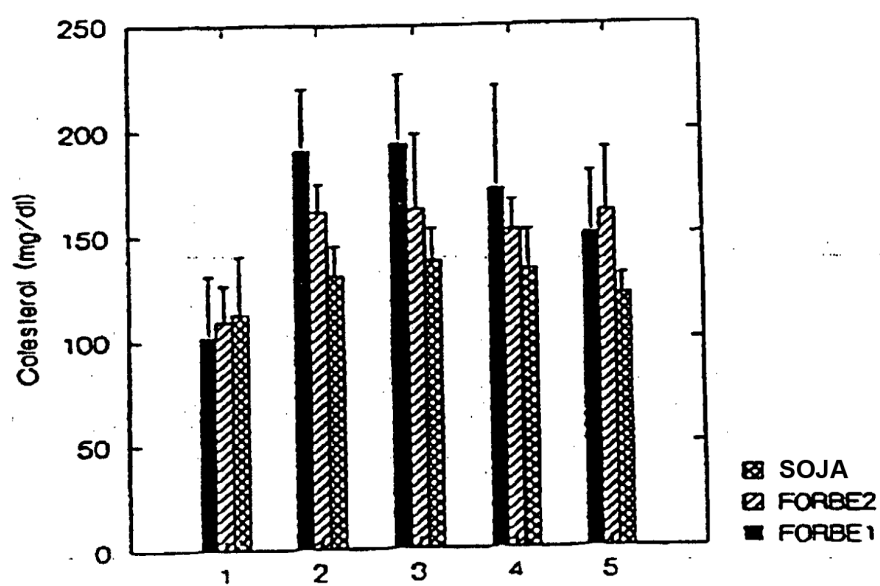


FIG 9

Efecto de los fitoesteroides sobre el colesterol-LDL

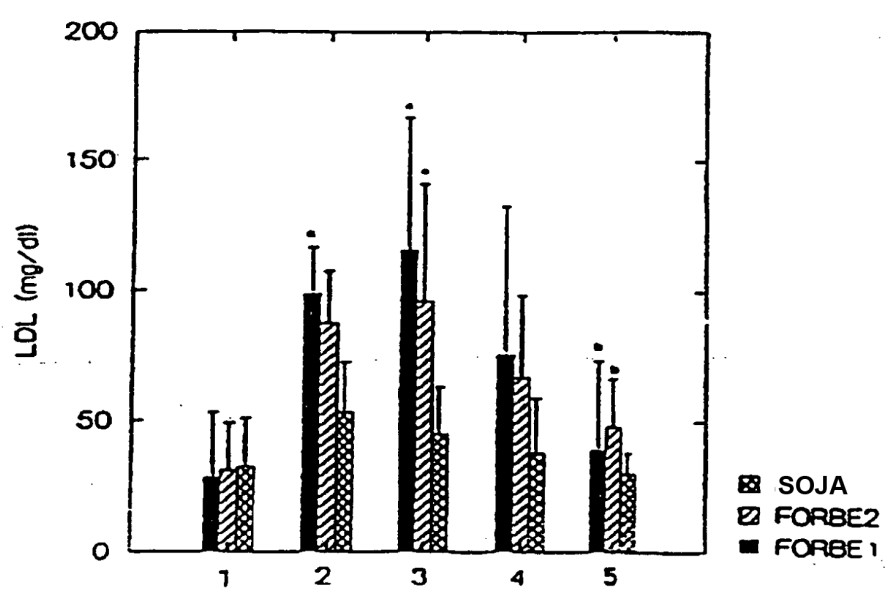


FIG 10

Efecto de los fitoesteroides sobre el HDL

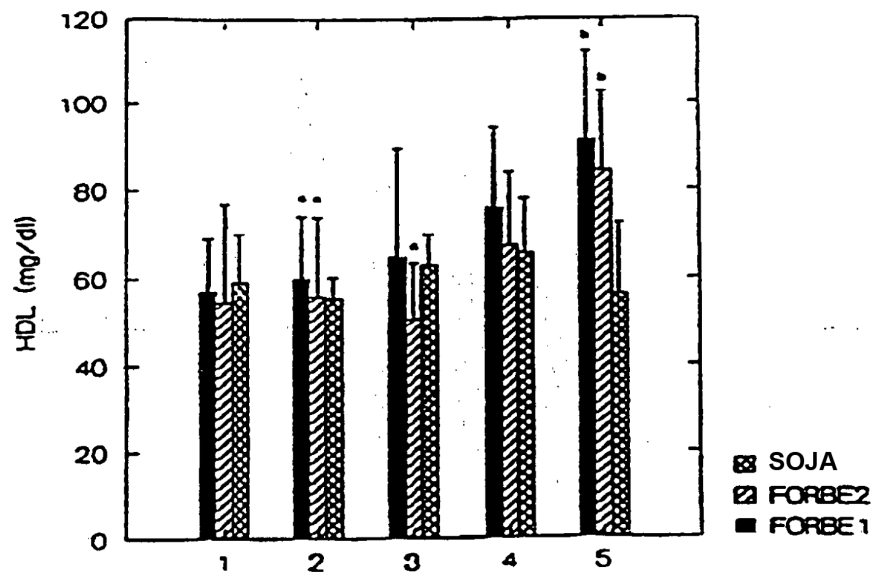


FIG 11

Fitoesteroides sobre el colesterol total sérico

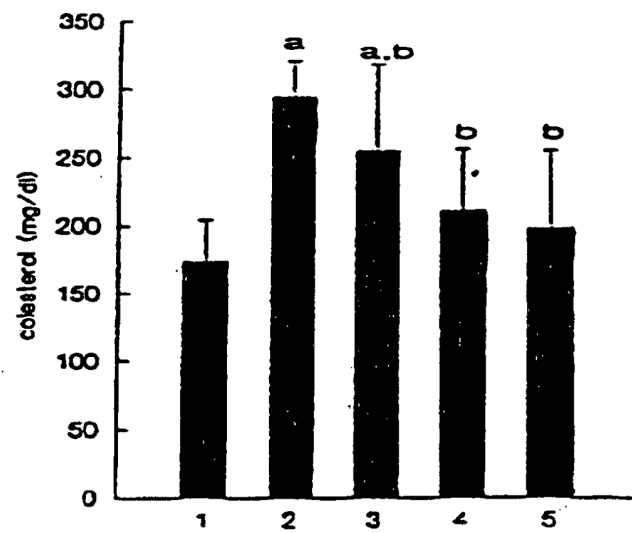


FIG 12

Fitoesteroides sobre el colesterol-LDL sérico

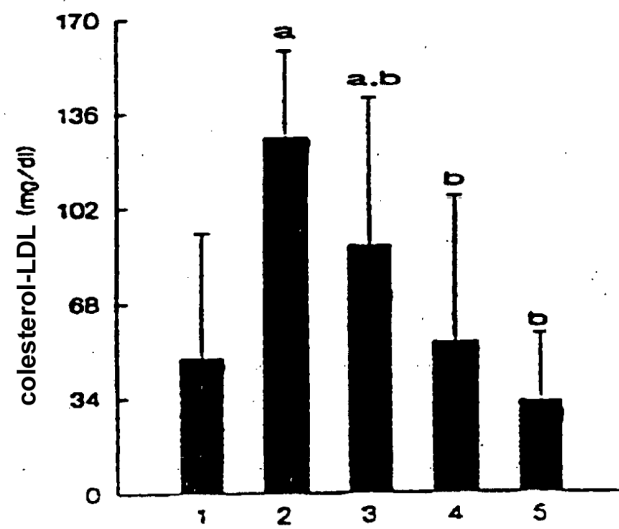


FIG 13

Fitoesteros sobre el colesterol-HDL sérico

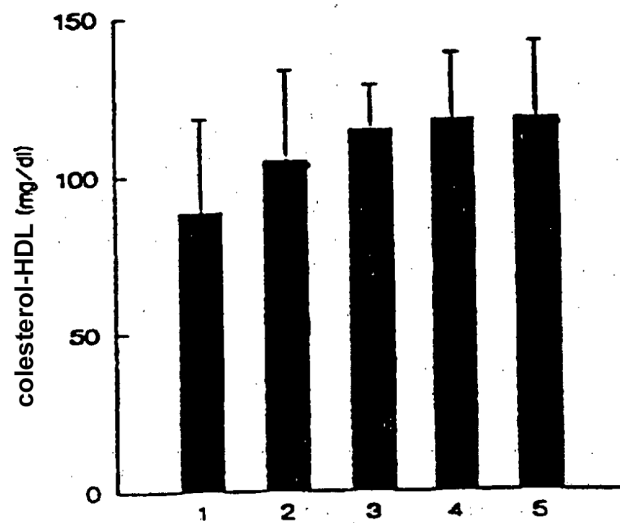


FIG 14

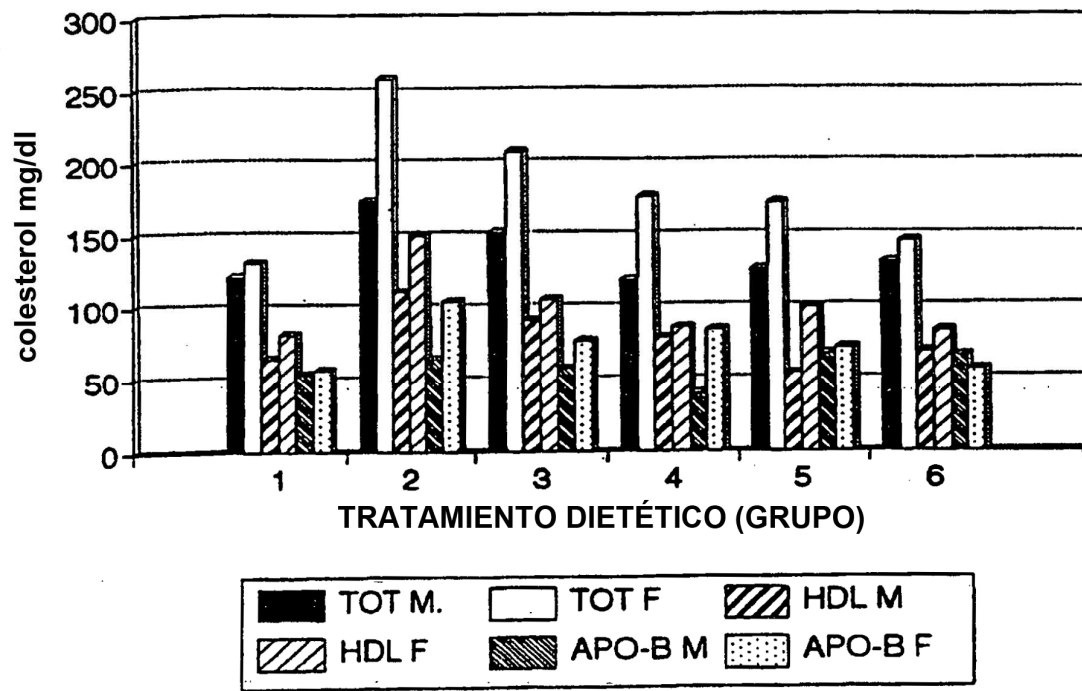


FIG 15

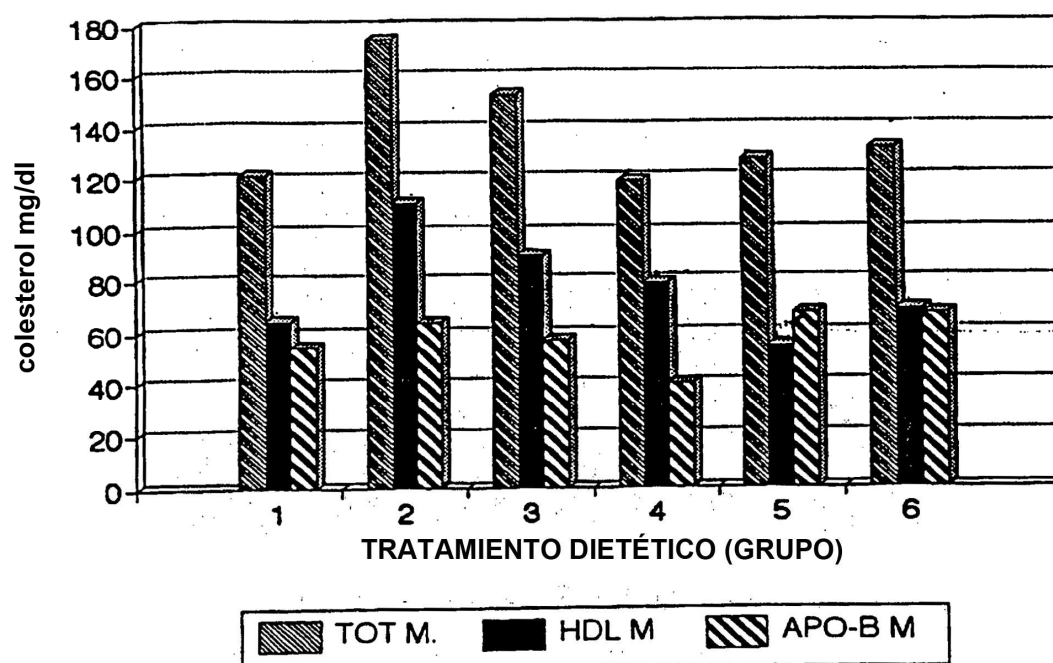


FIG 16

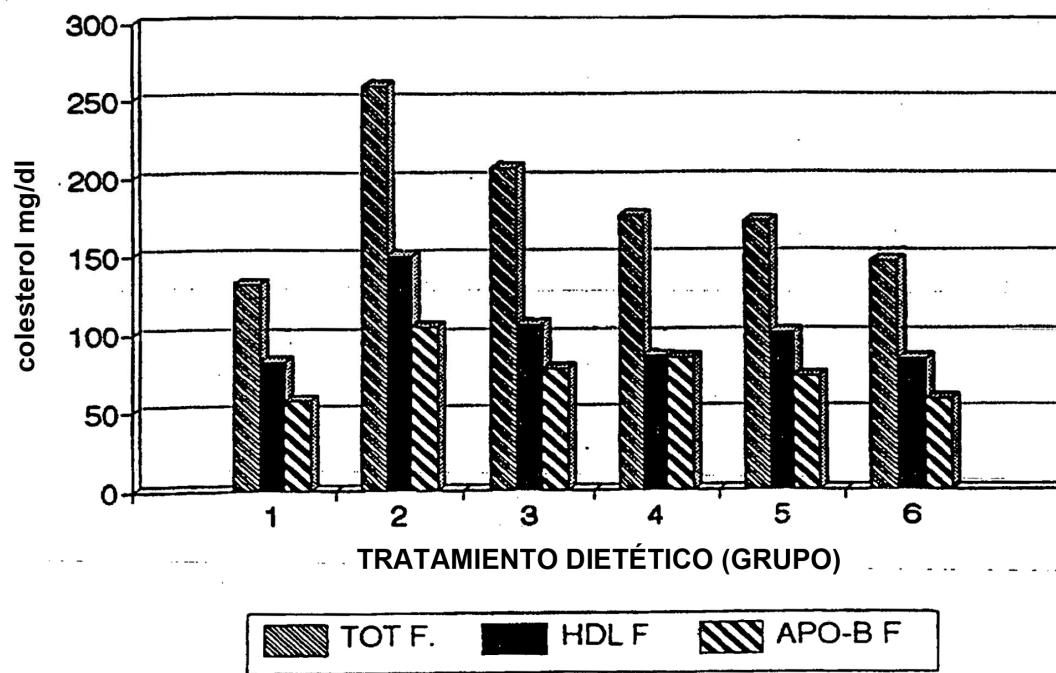


FIG 17

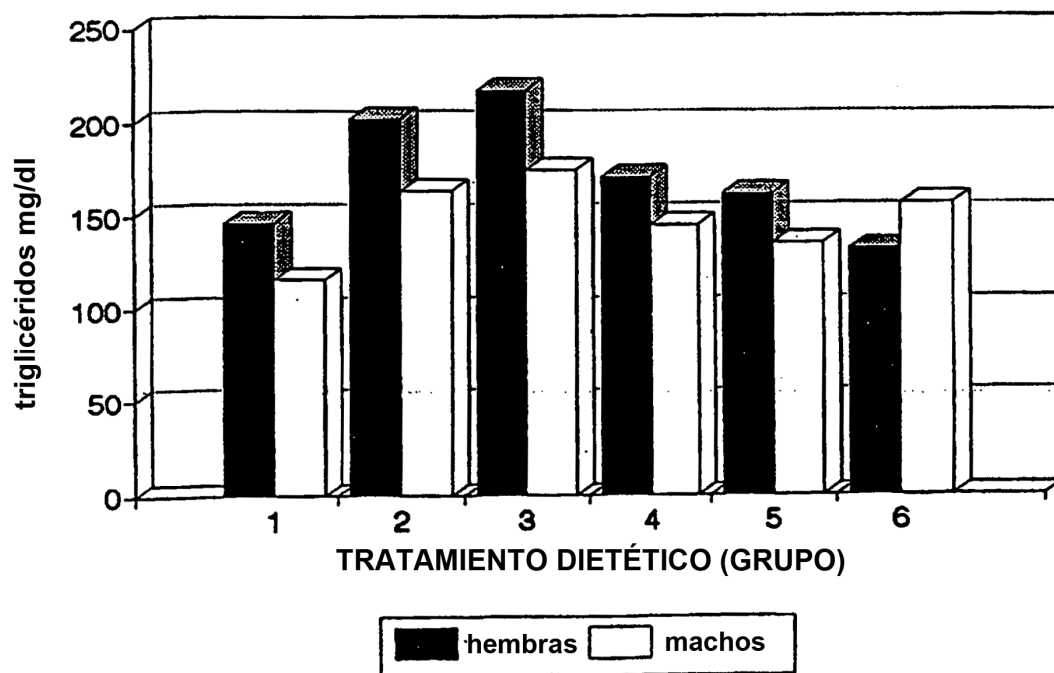


FIG 18

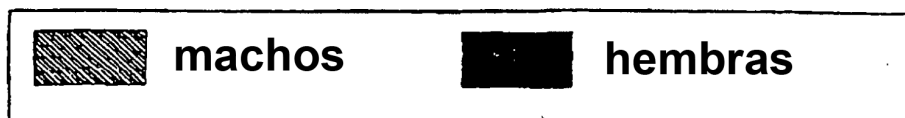
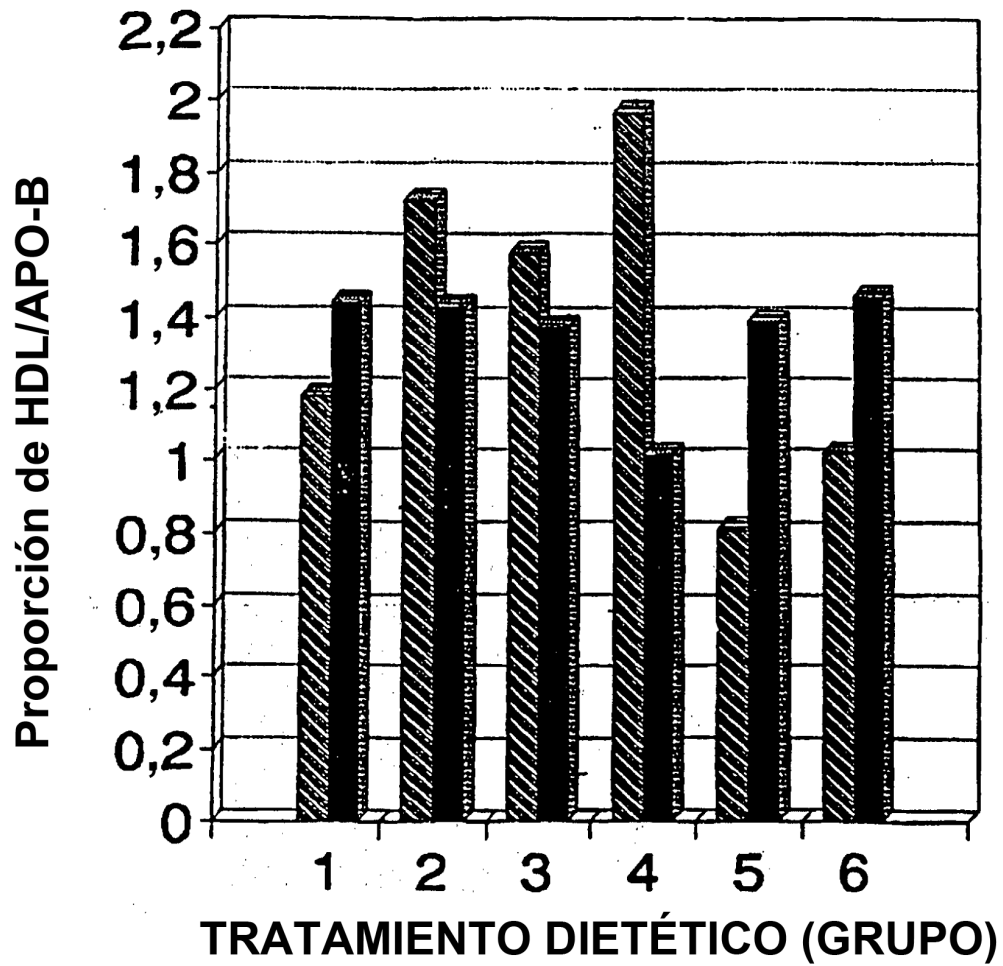


FIG 19

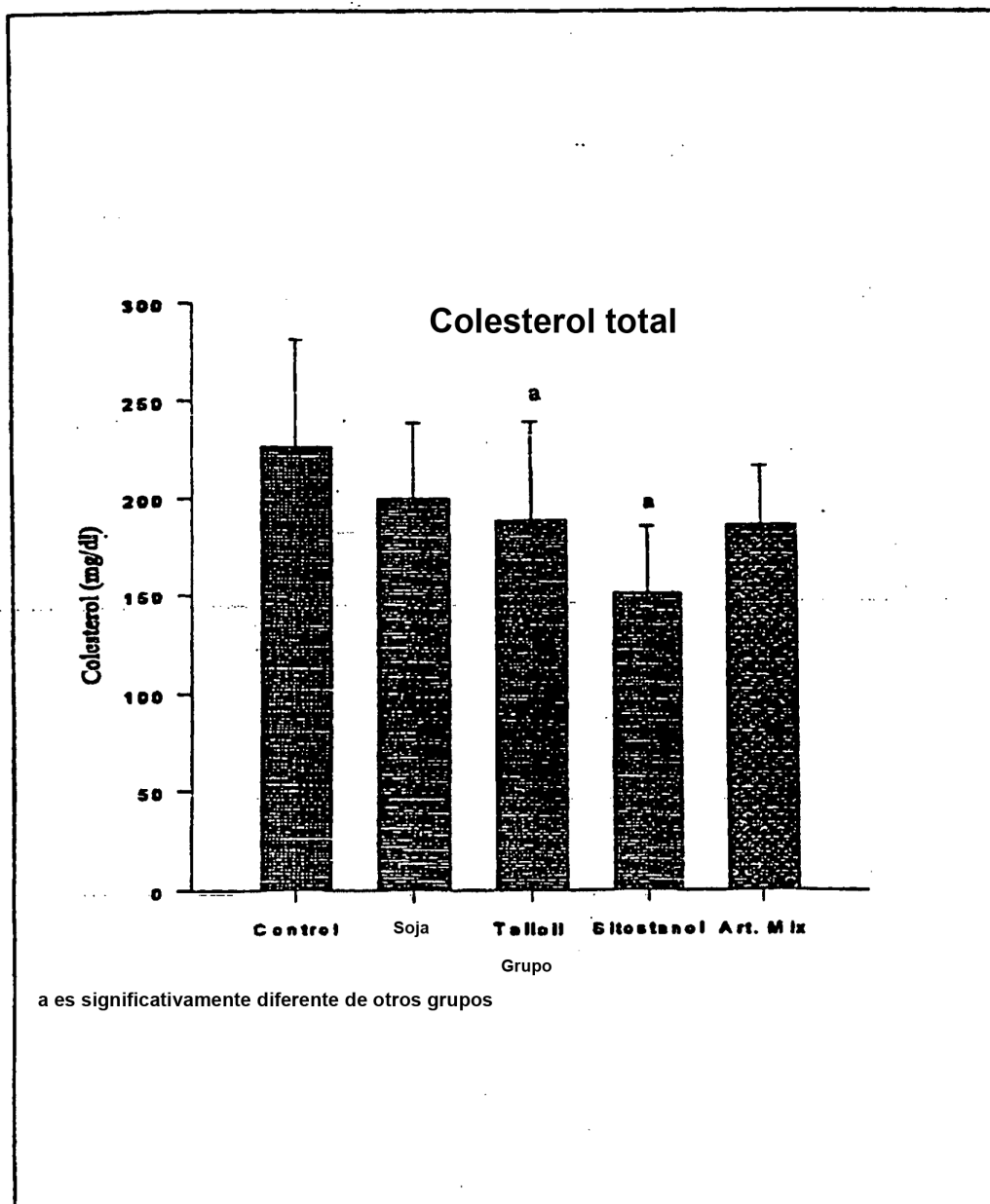


FIG 20

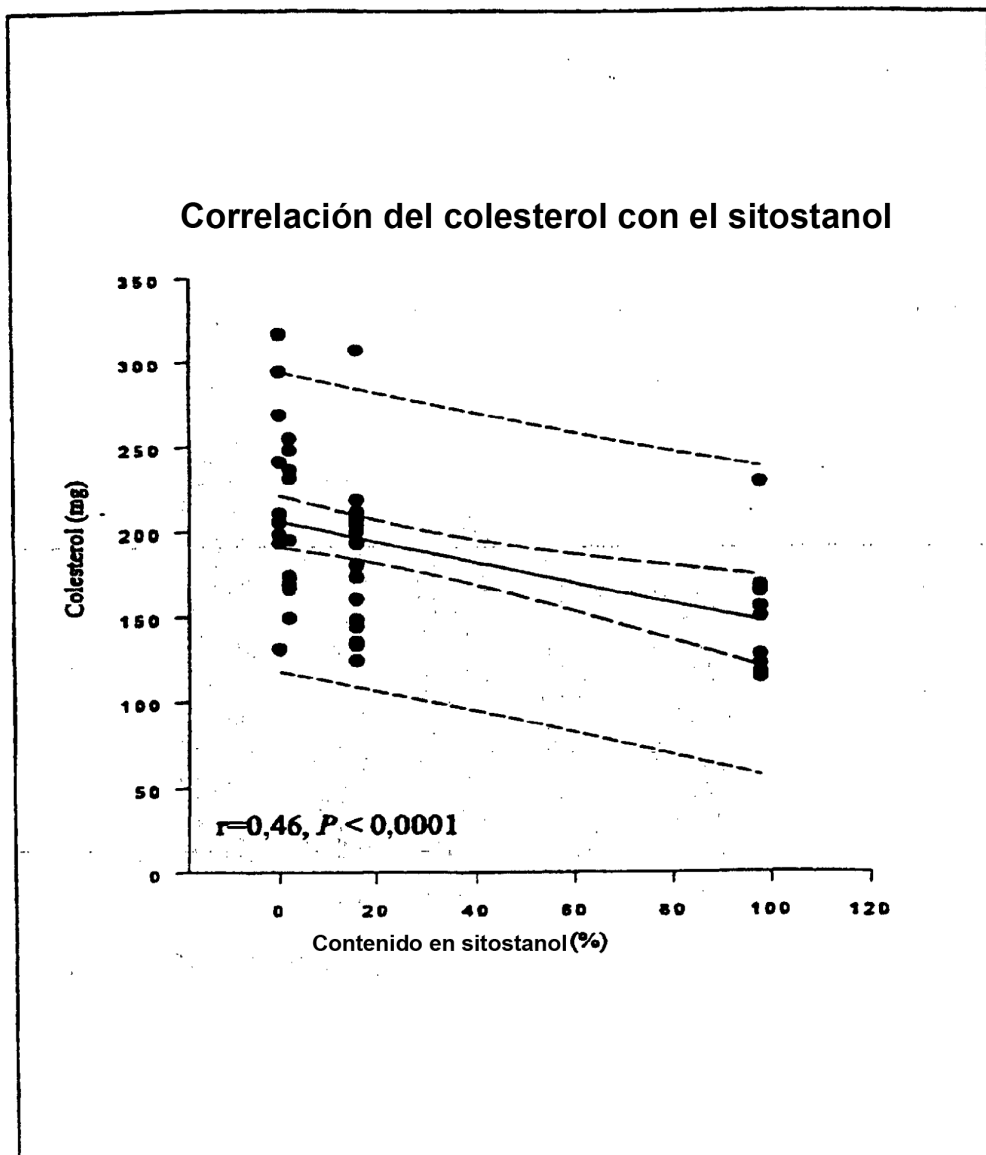


FIG 21

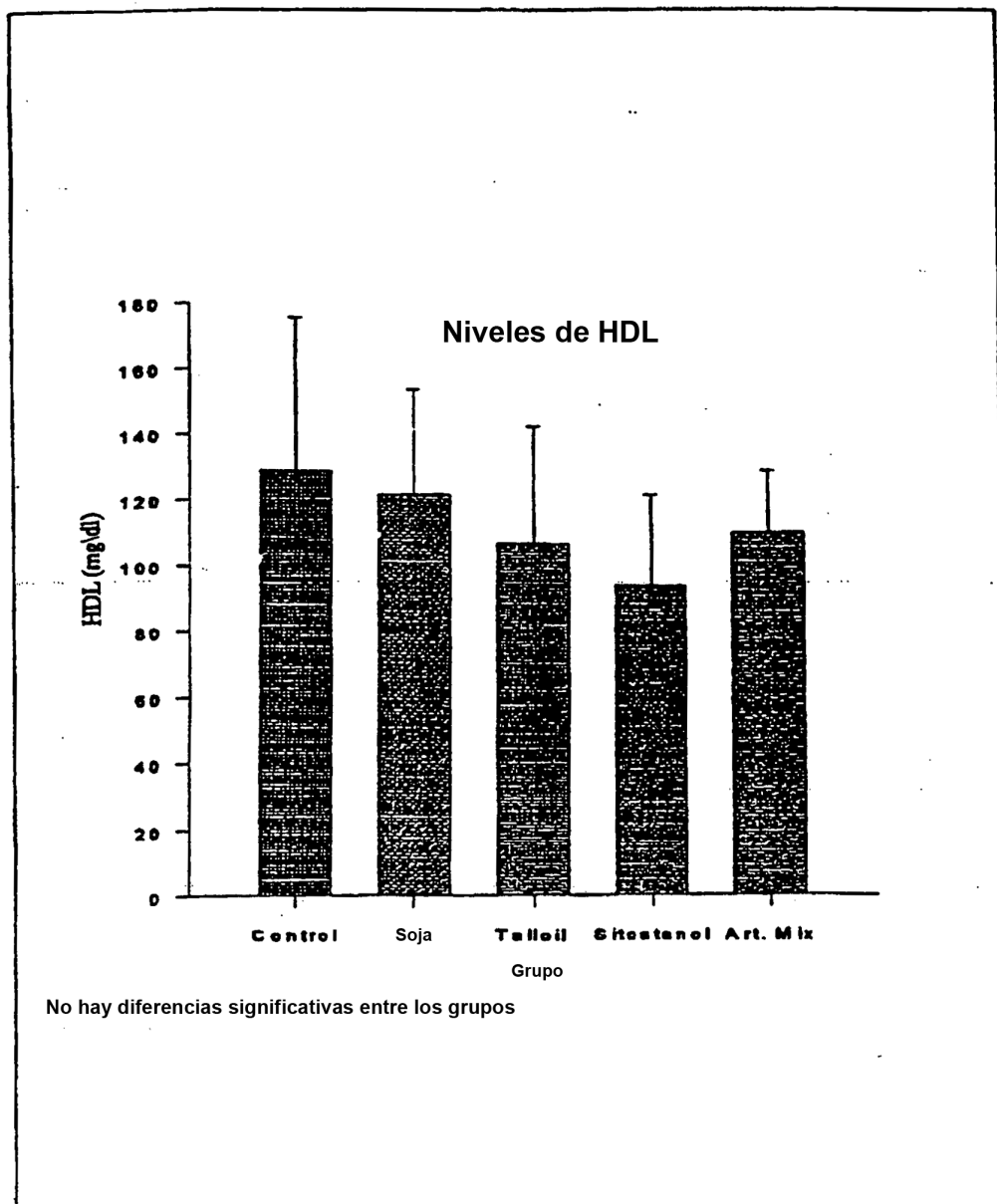


FIG 22

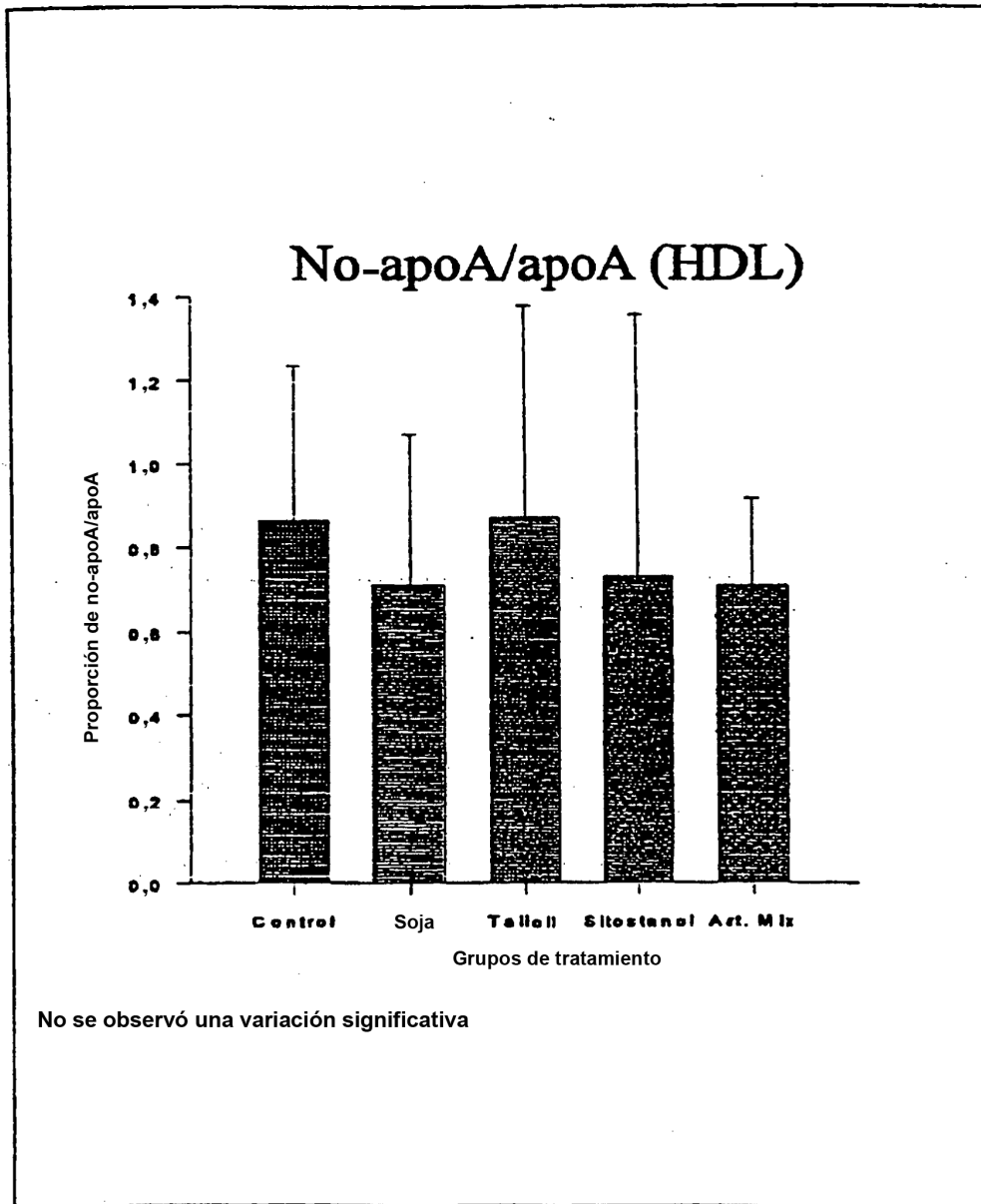


FIG 23

