



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 220 986**

51 Int. Cl.:
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

- 86 Número de solicitud europea: **96928481 .9**
86 Fecha de presentación : **02.09.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0871451**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.1998**

54 Título: **Composición que comprende ésteres de estanol vegetal y el uso del mismo para reducir el colesterol en el suero.**

30 Prioridad: **09.08.1996 FI 963126**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.12.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.11.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.11.2008**

73 Titular/es: **Raisio Benecol Ltd.**
P.O. Box 101
21201 Raisio, FI

72 Inventor/es: **Wester, Ingmar;**
Palmu, Tapio;
Miettinen, Tatu y
Gylling, Helena

74 Agente: **Aragónés Forner, Rafael Ángel**

ES 2 220 986 T5

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende ésteres de estanol vegetal y el uso del mismo para reducir el colesterol en el suero.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición de estanoles vegetales en forma esterificada que contiene un éster de ácido graso de sitostanol que se utiliza especialmente como sustancia para reducir el nivel de colesterol en el suero. Dicha composición puede utilizarse ventajosamente en aceites y grasas comestibles y en alimentos que
10 contienen grasas.

Antecedentes de la invención

Los esteroides vegetales son componentes esenciales de todas las plantas. Las funciones que desempeñan en las plantas se parecen a las funciones del colesterol en los mamíferos. Los esteroides vegetales que más abundan en la flora son el β -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol. La estructura química de estos esteroides vegetales es muy similar a la del colesterol, encontrándose las diferencias en la cadena lateral de la columna vertebral o cadena principal de la molécula. Por ejemplo, la cadena lateral del sitosterol contiene, en comparación con el colesterol, un grupo etilo adicional y la cadena lateral del campesterol, un grupo metilo adicional.
20

Desde los años 50 del siglo pasado, es un hecho bien conocido que los esteroides vegetales pueden reducir eficazmente los niveles de colesterol en el suero. Incluso cuando se administran en dosis relativamente pequeñas (unos pocos gramos al día), reducen con eficacia la absorbabilidad del colesterol biliar y alimentario, reduciendo por tanto los niveles de colesterol total y colesterol LDL en el suero (12, 28, véase también 27, 32). Aún no se conocen detalladamente los mecanismos que intervienen en la reducción de la absorción de colesterol, pero se supone que los esteroides vegetales desplazan el colesterol de la fase micelar, impidiendo así la absorción. En casi todos los primeros estudios, los esteroides que más interés despertaron fueron el sitosterol y su forma hidrogenada, el sitostanol. Sin embargo, no se documentó siempre íntegramente la composición de esteroides que presentaban las preparaciones probadas y las preparaciones de esteroides, que se utilizaron en la mayoría de dichos estudios, contenían también diversas cantidades de otros esteroides.
30

Se ha considerado que los esteroides vegetales constituyen una forma segura para reducir los niveles de colesterol en el suero debido a que son componentes naturales de aceites y grasas vegetales. Además, su absorción en el intestino de sujetos sanos es limitada y las cantidades limitadas absorbidas son excretadas por el cuerpo a través de la bilis. La velocidad a la que se absorben los esteroides vegetales varía entre individuos y distintos esteroides vegetales, pero, en el caso de humanos sanos, lo usual es que se absorban menos del 5% de esteroides vegetales en el tracto digestivo (27). Se ha demostrado no obstante que se llegan a absorber hasta un 10% de campesteroides alimentarios (20).
35

En el caso de alguna enfermedad excepcional, como la sitosterolemia, los esteroides vegetales se absorben muy eficientemente, mermándose también su eliminación del cuerpo por vía biliar. Los niveles de sitosterol y campesterol en el suero y los de sus formas saturadas, el sistostanol y campestanol, son muy elevadas. Los niveles elevados de estanoles saturados se deben muy probablemente a la mayor efectividad en su síntesis endógena más que a una mayor efectividad en su absorción (10, 27). Si no se trata adecuadamente, la sitosterolemia puede implicar la aparición de enfermedades coronarias del corazón y de la xantomatosis a edades muy tempranas. Para las personas con esta enfermedad, la administración de esteroides vegetales no saturados en cantidades superiores a las que se encuentran normalmente en los alimentos puede dar lugar a efectos peligrosos para la salud.
40 45

Lees y Lees (25) analizaron los efectos de tres preparaciones diferentes de sitosterol sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en el plasma. Una de estas preparaciones era Cytellin, una preparación comercial (Eli Lilly Co., USA), que contiene sitosterol en una cantidad de 60-65% y otros esteroides, principalmente campesterol, en una cantidad de 35-40%. Con una dosis media de 18g/día repartida en tres tomas se obtuvo en promedio un descenso del 10,5% en el colesterol total en el plasma y un descenso del 15% en el colesterol LDL en el plasma. Sin embargo, cuando se detectaron normalmente sólo rastros de esteroides vegetales, incluyendo el campesterol, en el plasma (10, 33), la concentración de campesteroides en el plasma oscilaba entre 4 y 21 mg/dl en los sujetos examinados por Lees y Lees (25). En la discusión de sus resultados, los autores remarcaron que al no conocerse la aterogenicidad del campesterol, no puede recomendarse el uso de una preparación de sitosteroides con un contenido relativamente elevado de campesterol, como la preparación Cytellin.
50 55

Por otra parte, Lees *et al.* (26) estudiaron la eficacia de los esteroides vegetales, procedentes del aceite de soja o talol, en la disminución del nivel de colesterol en la sangre. Utilizaron los distintos esteroides vegetales en dos formas físicas distintas, a saber, en forma de suspensión y en forma de polvos. El esteroide de soja comprendía 60-65% de sitosterol y 35% de campesterol y se suministró en dosis medias diarias de 18 g (de 9 a 24 g) de esteroides por día, repartidas en tres tomas diarias idénticas. En este estudio se utilizó también una preparación de esteroides de talol que sólo contenía aproximadamente 5% de campesterol. La dosis diaria utilizada en el estudio era de 3 gramos para los dos tipos de preparaciones de esteroide de talol utilizadas (preparaciones en polvo y en suspensión). Se hicieron también adicionalmente pruebas con una dosis de 6 gramos de la suspensión de esteroides de talol.
60 65

El esteroide de soja en las dos formas físicas estudiadas y el esteroide de talol en polvo redujeron en promedio en un 12% el contenido de colesterol en el plasma (26). Sin embargo, se detectó también en este estudio una absorbibilidad relativamente elevada del campesterol como ya se había detectado anteriormente. Los niveles de campesterol en el plasma, que presentaban los 5 pacientes estudiados, oscilaban entre 5 y 21 mg/dl (16 mg/dl de media). Por consiguiente, y a pesar de demostrar que el esteroide de soja presenta un efecto importante en la disminución del nivel de colesterol, los autores no recomiendan tampoco su uso como agente reductor de colesterol. Al contrario, recomiendan que las preparaciones farmacéuticas de esteroides vegetales deberían contener una cantidad mínima de campesterol y una cantidad máxima de sitosterol. En base a los dos estudios citados anteriormente, puede concluirse que el uso de esteroides de aceite vegetal, como los de soja, no es nada recomendable.

En la mayoría de los aceites vegetales, los esteroides vegetales saturados, como el sitostanol y el campestanol, se encuentran únicamente en cantidades muy pequeñas. No obstante, el talol contiene 10-15% de sitostanol, la forma saturada del sitosterol. El sitostanol puede formarse también por hidrogenación del enlace doble del sitosterol. En los estudios más recientes realizados tanto con animales experimentales como con humanos, se ha demostrado que el sitostanol es un agente reductor de colesterol más eficaz que el sitosterol (8, 16, 17, 18, 19, 36).

Otra ventaja del sitostanol es que es prácticamente inabsorbible. Varios estudios (p.ej., 9, 16, 17, 21) han demostrado que el sitostanol es prácticamente inabsorbible mientras que sí que pueden absorberse pequeñas cantidades (<5%) de su forma insaturada, el sitosterol (33). De forma análoga, un estudio *in vitro* realizado por Armstrong y Carey (6) demuestra también que el colestanol, una forma saturada del colesterol, es más hidrofóbico y menos absorbible que el colesterol.

Cuando se produce sitostanol por hidrogenación de fuentes comunes de esteroide vegetal, se forma también a partir del campesterol otro esteroide vegetal saturado, a saber, el campestanol. Hasta hace poco no se sabía casi nada sobre la absorbibilidad y el posible efecto hipocolesterolemico de este estanol. En base a los datos citados anteriormente, que señalan que los esteroides saturados son menos absorbibles que sus formas insaturadas, se puede deducir hipotéticamente que el campestanol podría ser prácticamente inabsorbible.

Para estudiar la absorbibilidad de distintos esteroides vegetales, Heinemann *et al.* (20) compararon la absorción intestinal de colesterol que se produce con el campesterol, sitosterol, estigmasterol, y también pequeñas concentraciones de sitostanol y campestanol en humanos utilizando técnicas de perfusión intestinal. Los resultados obtenidos demostraron que la velocidad de absorción de distintos esteroides vegetales varía de un esteroide vegetal a otro, siendo ésta en promedio del 4,2% en el caso del sitosterol, del 4,8% en el caso del estigmasterol, del 9,6% en el caso del campesterol, y del 12,5% en el del campestanol. Se detectaron grandes variaciones en la eficacia de absorción en los 10 sujetos masculinos estudiados.

Según Heinemann *et al.* (20), el campestanol se absorbía por tanto más eficientemente que la forma no saturada del campesterol. Esto contradice la suposición basada en los estudios mencionados anteriormente que señala que los esteroides saturados (sitostanol, colestanol) son menos absorbibles que los no saturados (sitosterol, colesterol). La razón de esta contradicción está sin embargo por aclarar. Heinemann *et al.* (20) conjeturan que este resultado conflictivo podría deberse al hecho de que el estudio de Armstrong y Carey (6) se hizo en condiciones *in vitro* y que la teoría en la que la hidrofobicidad constituye un factor importante en la agrupación y/o absorción micelar podría no ser relevante en las condiciones *in vitro*. Sin embargo, estas conjeturas no explican el hecho de que varios estudios, que demostraron la menor absorbibilidad del sitostanol con respecto a la del sitosterol, se realizaron en condiciones *in vivo*. Los resultados de Heinemann *et al.* (20), que están en conflicto con resultados anteriores, permanecen por tanto sin explicar por parte de los autores.

Sugano *et al.* (34) estudiaron la actividad hipocolesterolemica de esteroides de maíz (composición: 31% de campesterol, 4% de estigmasterol y 65% de sitosterol) y de estanoles de maíz (composición: 31% de campestanol y 69% de sitostanol) obtenidos por hidrogenación de una mezcla de esteroides de aceite de maíz. Realizaron dos experimentos con ratas. Tanto el esteroide como el estanol presentaron efectos hipocolesterolemicos a un nivel de 0,5-1% de la dieta al ingerir colesterol (1% en la dieta). En el primer experimento no se observó ninguna diferencia significativa entre el efecto hipocolesterolemico de los fitosteroides y los fitostanoles. En el segundo experimento, sin embargo, los fitostanoles presentaban, para los mismos niveles dietéticos, una capacidad en disminuir la concentración de colesterol en el plasma que era considerablemente mayor que la de los fitosteroides (estadísticamente significativa cuando $p < 0,02$). Además, los niveles de colesterol en el plasma de las ratas alimentadas con la dieta que contenía 1,0% de estanoles eran considerablemente inferiores ($p < 0,02$) a los de los animales alimentados con una dieta libre de colesterol. Esto no pudo observarse en las ratas alimentadas con la dieta que contenía 1,0% de esteroides.

Sugano *et al.* (34) no estudiaron las diferencias en el efecto hipocolesterolemico que presentan las mezclas de estanoles con un contenido elevado en sitostanol y un contenido bajo en campestanol (basadas en esteroides de talol) en comparación con las mezclas de estanoles que contienen un nivel de campestanol considerablemente superior (basadas en esteroides de aceites vegetales). Los autores compararon el efecto hipocolesterolemico de una mezcla de esteroides no saturados con el de una mezcla de los correspondientes estanoles saturados. Los estudios posteriores que realizó este grupo de investigación se centraron en el efecto reductor de niveles de colesterol que presenta en particular el sitostanol, comparándolo con el del sitosterol (21, 22, 23, 35). De hecho, en una publicación posterior (23) hacen referencia al estudio del fitostanol mencionado anteriormente (34), señalando únicamente el efecto hipocolesterolemico del β -sitostanol en comparación con el del β -sitosterol, sin analizar los efectos hipocolesterolemicos de los esteroides satu-

rados (incluyendo el campestanol) en comparación con los de los esteroides no saturados. En los estudios posteriores mencionados anteriormente, se utilizaron mezclas de esteroides que presentaban una composición típica de esteroides hidrogenados de talol y un contenido elevado de sitostanoles (>90%).

Miettinen y Vanhanen (30) demostraron que para la reducción del nivel de colesterol en el suero el sitostanol en una forma de éster de ácido graso es más efectivo que el sitostanol libre. Estudios posteriores han demostrado también que el uso de ésteres de sitostanol como parte integrante de una dieta diaria constituye una forma efectiva para reducir las concentraciones de colesterol total y de colesterol LDL en el suero (13, 14, 15, 31, 37, 38). La ventaja de utilizar ésteres de estanol en lugar de estanol libre es que los ésteres de estanol son también solubles en grasa, por lo que pueden incorporarse fácilmente en una amplia variedad de alimentos sin modificar el sabor, aroma o comportamiento físico del producto final. En la patente norteamericana n° 5.502.045 (2) se exponen el método para preparar ésteres de ácido graso de sitostanol y el uso de ésteres de estanol soluble en grasa en productos alimenticios.

Straub (3) sugiere el uso de estanoles saturados (sitostanol, clionastanol, 22,23-dihidrobrasicastanol, campestanol y mezclas de los mismos) en un método para preparar una composición aditiva alimentaria en el que los estanoles se mezclan con un agente solubilizante comestible, una cantidad efectiva de un antioxidante apropiado y una cantidad efectiva de un dispersante apropiado. Estos aditivos alimentarios sirven supuestamente para reducir la absorción del colesterol de alimentos y bebidas que contienen colesterol, como, p.ej., huevos y productos lácteos. Sin embargo, en esta patente no se presenta ningún dato que describa los efectos clínicos o la absorción de los esteroides alimentarios.

Eugster *et al.* (1) exponen el uso de pequeñas cantidades de esteroides, de los correspondientes ésteres de ácidos grasos y de glucósidos para el tratamiento de tumores. Los métodos de preparación propuestos por Eugster *et al.* implican el uso de reactivos químicos peligrosos, como N,N'-carbonildiimidazol, cloruro de tionilo, y solventes como tetrahidrofurano, benceno, cloroformo o dimetilformamida. Eugster *et al.* comentan la posibilidad de utilizar estas sustancias como alimentos dietéticos o aditivos alimentarios, pero no presentan ningún dato sobre sus efectos hipocolesterolémicos ni ninguna reivindicación que cubra dicho uso. De lo expuesto por Eugster *et al.* resulta difícil formarse una imagen clara de cómo se purifica el producto final para obtener cantidades suficientemente grandes de un éster de estanol suficientemente puro como para poder utilizarlo como componente alimentario. Los únicos procesos de purificación a los que se hace referencia son la cromatografía de capa fina y la cromatografía líquida de alto rendimiento. El método de preparación aludido en la patente de Eugster *et al.* se limita por consiguiente a la preparación de pequeñas cantidades.

La patente norteamericana n° 3.751.569 (4) expone la adición de ésteres de ácidos grasos de esteroides vegetales a aceites de cocina con el fin de reducir los niveles de colesterol en el suero humano. Para la esterificación de los esteroides libres, la patente propone un método que no satisface en absoluto los requisitos establecidos para la preparación de un producto de calidad alimentaria. Según la patente, la esterificación se realiza entre un esteroide libre y un anhídrido de ácido graso utilizando ácido perclórico como catalizador. Este catalizador y reactivo no son admisibles en procedimientos alimentarios. Además, la patente se refiere únicamente a ésteres de ácidos grasos procedentes de esteroides de plantas autóctonas. El método propuesto en la patente alemana DE 22 48 921 (5) para la esterificación de esteroides de aceites y grasas mediante técnicas de interesterificación químicas sí que satisface los criterios establecidos para procesos alimentarios. En esta patente, se agregan esteroides libres y ésteres de ácido graso en exceso a una mezcla de aceites o grasas, interesterificándose seguidamente toda la mezcla de grasas mediante una técnica de interesterificación bien conocida. En la mezcla de grasas resultante, se han transformado prácticamente todos los esteroides libres en ésteres de ácido graso. El objetivo perseguido consiste en proteger los esteroides libres contenidos en aceites animales y vegetales contra posibles alteraciones durante el procesamiento.

Datos anteriores demuestran que el campesterol, uno de los esteroides vegetales más importantes, se absorbe de forma relativamente eficaz. Se ha recomendado por tanto utilizar únicamente mezclas de esteroides vegetales que contengan una cantidad mínima de campesterol. Esto se ha traducido en la práctica en el uso de mezclas de esteroides, como las de esteroides de talol, que presentan un alto contenido en sitosterol.

La mayoría de los estudios realizados sobre los estanoles se centran exclusivamente en el sitostanol. El estudio de Heinemann *et al.* (20), que demuestra que el campestanol, la forma saturada del campesterol, se absorbe más fácilmente que el campesterol o el sitosterol (12,5%, 9,6% y 4,2%, respectivamente), ha originado el "consenso general" de que las mezclas de esteroides saturados con niveles "elevados" de campestanol son peligrosas debido a la absorción del campestanol. Una prueba de ello es que todos los estudios clínicos que tratan del uso de estanoles (sitostanol) se centran en mezclas de esteroides con un alto nivel de sitostanol y un bajo nivel de campestanol.

Es un hecho bien establecido a partir de varios estudios realizados (p.ej., 8, 17, 18, 19, 23, 36), que el sitostanol, la forma saturada del sitosterol, reduce de forma más efectiva el nivel de colesterol en la sangre que el correspondiente sitosterol insaturado. Además, los esteroides saturados se absorben en cantidades muy pequeñas, por lo que el uso de esteroides saturados constituye un medio seguro para reducir el colesterol sobre la base de poblaciones. De los esteroides no saturados, se destaca sobre todo el campesterol, produciéndose su absorción en cantidades suficientemente elevadas como para que no se recomiende utilizar mezclas de esteroides con niveles elevados de campesterol (p.ej., mezclas de esteroides basadas en aceite vegetal) (25, 26).

Se han formado por consiguiente muchos prejuicios en contra del uso de cantidades importantes de campestanol como sustancia a agregar en productos alimenticios, por los que se ha limitado también radicalmente el espectro de

materias primas con contenidos de fitosterol a las que contienen cantidades relativamente pequeñas de campesterol y de su forma saturada, el campestanol.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de estanol vegetal que contienen sitostanol como componente principal y además cantidades sustanciales de campestanol y que consisten en composiciones esterificadas como composiciones de ésteres de ácido graso que sirven para reducir el nivel de colesterol en el suero sanguíneo.

Estas composiciones de ésteres de ácido graso de estanol, que contienen éster de ácido graso de sitostanol como componente principal y también cantidades sustanciales de éster de ácido graso de campestanol, pueden utilizarse en productos comestibles como un componente dietético para disminuir los niveles de colesterol en el suero sanguíneo.

El objetivo de la presente invención es el de ampliar el espectro de materias primas vegetales que son de utilidad en la preparación de sustancias para productos comestibles y, en particular, para aceites y grasas comestibles y productos alimenticios que contienen grasas, sirviendo dichas sustancias para controlar los niveles de colesterol en el suero sanguíneo. La presente invención hace que sea posible utilizar como materia prima para dichos fines aceites y grasas vegetales que además de contener sitosterol contienen también una cantidad importante de campesterol.

Las materias primas apropiadas para ser utilizadas en la preparación de las composiciones de la presente invención son, p.ej., maíz, semillas de soja, semillas de colza, así como otras plantas que presentan una composición de fitosteroles con contenidos elevados de campesterol.

La composición novedosa de la presente invención puede incorporarse en sustancias alimenticias como aceites de cocina, margarinas, mantequilla, mayonesa, aliños, mantecas, quesos (incluyendo quesos curados y tiernos) y otros productos alimenticios que contienen grasas.

La composición de la presente invención puede consumirse también directamente tal cual.

Descripción detallada de la invención

Los elementos característicos de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Según la presente invención, la composición de ésteres de ácido graso de estanoles vegetales contiene, además del componente principal, éster de ácido graso de sitostanol y también una cantidad considerable de por lo menos 20% de éster de ácido graso de campestanol.

La composición contiene preferentemente 20% a 40%, y preferentemente 25% a 35%, p.ej., 30%, de éster de ácido graso de campestanol. Se ha esterificado la composición para que sea lipofílica.

Todas las cantidades porcentuales indicadas en esta memoria se refieren a porcentajes en peso, a no ser que se exprese otra especificación. Los números indicados en esta memoria entre paréntesis hacen referencia a las publicaciones enumeradas en la lista de referencias adjunta.

Los datos obtenidos demuestran sorprendentemente y en contraposición a los prejuicios existentes que una mezcla de ésteres de ácido graso de estanol hidrogenado, que contiene éster de ácido graso de sitostanol como componente principal y además cantidades sustanciales de éster de ácido graso de campestanol, es por lo menos tan efectiva como una mezcla de ésteres de ácido graso de estanol, que contiene más de 90% de éster de ácido graso de sitostanol y pequeñas cantidades de éster de ácido graso de campestanol, indicando esto que el campestanol es por lo menos tan efectivo como el sitostanol en la disminución de la absorción de colesterol. Además, los datos relativos al estanol obtenidos mediante análisis de suero sanguíneo demuestran que no se absorbe prácticamente campestanol, siendo su contenido en el suero sanguíneo aproximadamente un 40% inferior al del sitostanol. Por consiguiente, una mezcla de ésteres de ácido graso de estanol, que contiene éster de ácido graso de sitostanol como componente principal y cantidades importantes de éster de ácido graso de campestanol, debe considerarse por lo menos tan segura como una mezcla convencional de ésteres de ácido graso de estanol basada en esteroides de talol. Este dato contrasta con la opinión actual respecto a la eficacia e inocuidad de las mezclas de estanoles con cantidades elevadas de campestanol (véase 20, 27, 34).

En la patente norteamericana US n° 5.502.045 (2) se mostró que los ésteres de ácido graso de sitostanol son más eficaces en la disminución del nivel de colesterol en la sangre que el sitostanol libre. Estudios posteriores confirmaron claramente el efecto reductor de niveles de colesterol que presentaba una margarina que contenía ésteres de ácido graso de sitostanol solubles en grasa (p.ej., 31).

El uso de ésteres de ácido graso de estanol en lugar de estanoles libres es crucial para una amplia utilización de los estanoles en varios productos alimenticios que contienen grasas, debiéndose esto al hecho de que sólo los ésteres de ácido graso de estanol pueden solubilizarse en aceites y grasas comestibles en cantidades suficientemente elevadas como para alcanzar los niveles que son eficaces en la disminución de la absorción de colesterol biliar y alimentario en el tracto digestivo.

La solubilidad de los ésteres de estanol en aceites y grasas comestibles es de un 35-40%, mientras que la solubilidad de los esteroides en aceites y grasas comestibles no llega a superar el 2 por ciento en peso a una temperatura de 21°C (24). Se podrían incorporar cantidades mayores utilizando diversos agentes surfactivos, solubilizantes o dispersantes, pero incluso con el uso de estas sustancias no se puede asegurar la solubilidad en grasas. El uso de dichas sustancias está limitado o incluso prohibido por ley. Además, los esteroides libres, en cantidades que ascienden al 1%, influyen sobre las propiedades físicas de la grasa o del aceite, causando cambios en la estructura y en el comportamiento físico de los productos. Esto no ocurre cuando se utilizan ésteres de ácido graso de estanol al poder modificar fácilmente las propiedades físicas de la mezcla de grasas alterando la composición del ácido graso de la mezcla.

Los ésteres de ácido graso de estanol pueden incorporarse obviamente también en otros productos alimenticios que no son margarinas o pastas para untar según lo descrito en esta invención. En la patente norteamericana US n° 5.502.045 (2) se presentan también otros ejemplos de posibles usos. No obstante, a cualquier experto en la materia le resultará evidente la posibilidad de agregar ésteres de ácido graso de estanol a una amplia variedad de productos alimenticios y, en particular, a los que contienen grasas.

Se han propuesto diversos métodos para preparar ésteres de ácido graso de esteroides. El inconveniente de casi todos estos métodos es que utilizan reactivos que no pueden admitirse en la producción de un producto destinado a ser utilizado como macronutriente en algún alimento. El uso de estos reactivos tóxicos como cloruro de tionilo o derivados anhidricos de ácidos grasos es común.

El método preferido para la preparación de ésteres de ácido graso de estanol está descrito en la patente norteamericana US n° 5.502.045 (2). Este procedimiento se basa en un proceso de interesterificación ampliamente utilizado en la industria de aceites y grasas comestibles. Este proceso de esterificación se diferencia convenientemente de los métodos anteriores por no utilizar sustancias que no sean el estanol libre, un éster de ácido graso o una mezcla de ésteres de ácido graso y un catalizador de interesterificación como el etilato de sodio. Una característica importante de este método es que uno de los reactivos, el éster de ácido graso, se utiliza en exceso y actúa como solvente, solubilizando el estanol en las condiciones consideradas (vacío de 5-15 mmHg). La reacción proporciona una mezcla de ésteres de ácido graso y ésteres de ácido graso de estanol. El éster de ácido graso de estanol puede concentrarse fácilmente por destilación al vacío en éster de ácido graso de estanol casi duro, eliminándose con dicha destilación los ésteres de ácido graso en exceso. De forma alternativa, se puede agregar la mezcla tal cual a la mezcla final de grasas antes de efectuar la etapa de desodorización.

Los estanoles se encuentran en pequeñas cantidades en productos naturales como, p.ej., trigo, centeno, maíz y triticaria, por lo que están contenidos en pequeñas cantidades (11, 14) en el alimento diario. Los estanoles pueden producirse fácilmente por hidrogenación de mezclas de esteroides naturales. A principios del año 1996, las únicas mezclas de esteroides que se podían adquirir en el mercado con la pureza suficiente (contenido de estanol > 98%) como para poder utilizarlas tal cual en alimentos eran las de talol. Esteroides vegetales con cantidades importantes de campesterol, como las mezclas de esteroides basados en aceite vegetal, puede obtenerse, p.ej., como subproducto en la producción de tocoferol a partir de destilados de aceite vegetal. Los esteroides vegetales así obtenidos pueden convertirse en estanoles mediante técnicas de hidrogenación bien conocidos como las basadas en el uso de un catalizador de Pd/C en solventes orgánicos (7). Como sabrá cualquier experto en la materia, hay una amplia variedad de solventes y catalizadores de Pd que pueden utilizarse para efectuar la hidrogenación, que si se realiza en condiciones optimizadas sólo deja pequeñas cantidades de esteroides insaturados sin convertir, manteniéndose la formación de los típicos subproductos deshidroxilados, estanos y estenos, en niveles muy reducidos (<1,5%).

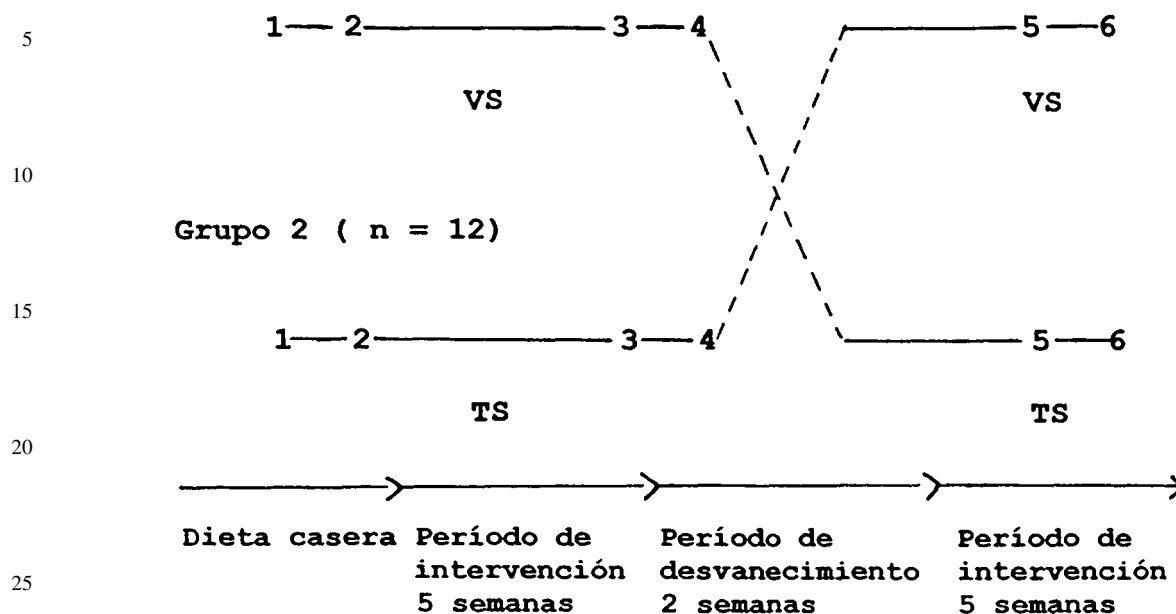
La presente invención compara el efecto hipocolesterolémico de una mezcla de ésteres de ácido graso de estanol con contenidos elevados de éster de ácido graso de sitostanol, siendo este último un estanol vegetal que los expertos en la materia suelen considerar como el más seguro y efectivo en la reducción de la absorción de colesterol y, por consiguiente, en la disminución de los niveles de colesterol en el suero, con el de una mezcla de ésteres de ácido graso de estanol, que contiene una cantidad importante de éster de ácido graso de campestanol. En esta memoria se publican por primera vez los efectos hipocolesterolémicos que presentan los estanoles basados en aceite vegetal y en forma esterificada sobre el ser humano. La presente invención es la primera que demuestra que una mezcla de ésteres de ácido graso de estanol, que contiene una cantidad importante de éster de ácido graso de campestanol (superior al 20% y preferentemente del 30%), es por lo menos tan efectiva como las mezclas de ésteres de ácido graso de estanol que presentan altos niveles de éster de ácido graso de sitostanol. Además, los resultados del presente estudio indican claramente que, en contraste con lo publicado por Heinemann *et al.* (20), el campestanol no se absorbe prácticamente.

Estudios clínicos

Para estudiar los efectos hipocolesterolémicos de margarinas de éster de estanol de aceite vegetal y de éster de estanol de talol, se diseñó un estudio de doble transición oculta de 5 semanas que comprende un período de desvanecimiento de 2 semanas de duración. El ensayo del estudio se dispuso de la forma siguiente:

Disposición del ensayo del estudio de la intervención

Los números 1-6 hacen referencia a las muestras de sangre tomadas durante la dieta casera (1, 2), después del primer período de intervención (3, 4) y después del segundo período de intervención (5, 6). VS = margarina de éster de estanol de aceite vegetal, TS = margarina de éster de estanol de talol.

Grupo 1 (n =12)

Veinticuatro voluntarias, mujeres no hospitalizadas y sanas, que presentaban un nivel moderadamente elevado de colesterol (media de $6,12 \pm 0,16$ mmol/l), consumieron en orden aleatorio y como parte de su dieta diaria aproximadamente 25 g diarios de margarina de prueba (una tarrina de 250 g/10 días). Los contenidos de lípidos (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos) y de esteroles en el suero se midieron durante la dieta casera y al final de cada período de prueba. Se efectuaron siempre dos tomas de muestras de sangre separadas por un lapso de tiempo de una semana, tanto durante la dieta casera como al final de cada período de consumo de margarina de prueba. En la siguiente Tabla 1 se indican los valores de lípidos que se detectaron así en el suero.

TABLA 1

Concentraciones de lípidos en suero (mmol/l, media \pm SE) durante la dieta casera y después de 5 semanas de tratamiento con margarina de éster de estanol de aceite vegetal (VS) y margarina de éster de estanol de talol (TS), (n = 24).			
	Dieta casera	VS	TS
Colesterol total	$6,12 \pm 0,16$	$5,77 \pm 0,18^*$	$5,95 \pm 0,23$
Colesterol LDL	$4,03 \pm 0,15$	$3,60 \pm 0,17^*$	$3,76 \pm 0,19^*$
Colesterol HDL	$1,54 \pm 0,09$	$1,62 \pm 0,09^*$	$1,63 \pm 0,10^*$
Triglicéridos	$1,22 \pm 0,13$	$1,20 \pm 0,11$	$1,26 \pm 0,15$

* $p < 0,05$ o menos

Las dos margarinas provocaron cambios favorables en los lípidos contenidos en suero. La disminución de los valores de colesterol LDL y el aumento en los valores de colesterol HDL son importantes desde el punto de vista estadístico ($p < 0,05$ o menos). Además, el éster de estanol basado en aceite vegetal proporcionó también una disminución estadísticamente importante del colesterol total. Las disminuciones de colesterol total y colesterol LDL que se obtuvieron eran mayores en el caso de la margarina de éster de estanol basado en aceite vegetal que en el caso de la margarina de éster de estanol basado en talol. No se observaron cambios en los niveles de triglicéridos. Los resultados de lípidos en el suero indican que una margarina de éster de estanol de aceite vegetal, que contiene una cantidad importante de campestanol en la fracción de estanol, puede ser incluso más efectiva que la margarina de éster de estanol de talol. Estudios anteriores (14, 15, 31) demostraron que la margarina de éster de estanol de talol presenta efectos hipocolesterolémicos significativos. Se puede concluir por tanto en base al presente estudio de diseño cruzado que los estanoles basados en aceite vegetal presentan efectos hipocolesterolémicos que son por lo menos tan efectivos como los de los estanoles basados en talol.

Las concentraciones de esteroides en el suero se cuantificaron mediante cromatografía de gases- líquidos según un método publicado anteriormente (29, incorporado por referencia al presente documento). Se calcularon los valores medios de las dos medidas de lípidos en suero realizadas con las muestras de sangre tomadas en cada uno de los periodos del estudio. En las siguientes Tablas 2 y 3 se presentan los datos correspondientes a las concentraciones medias de esteroides vegetales medidas en el suero durante la dieta casera y después de cada período de prueba y los datos correspondientes a las variaciones medias de dichas concentraciones.

TABLA 2

Concentraciones de esteroides vegetales en suero (media \pm SE, $\mu\text{g/dl}$) durante la dieta casera y después de cada período de intervención (n = 24). VS = margarina de éster de estanol basado en aceite vegetal, TS = margarina de éster de estanol basado en talol.			
	Dieta casera	VS	TS
Campestanol	47 \pm 2	58 \pm 3	47 \pm 3
Sitostanol	94 \pm 3	92 \pm 5	96 \pm 5
Campesterol	472 \pm 37	337 \pm 25	350 \pm 28
Sitosterol	277 \pm 17	198 \pm 12	227 \pm 15
* p<0,05 o menos			

TABLA 3

Variaciones medias (\pm SE) en las concentraciones de esteroides vegetales en el suero ($\mu\text{g/dl}$), (n = 24). VS = margarina de éster de estanol basado en aceite vegetal, TS = margarina de éster de estanol basado en talol, HD = dieta casera.			
	Δ (VS - HD)	Δ (TS - HD)	Δ (VS - TS)
Campestanol	11 \pm 2*	0 \pm 2	11 \pm 2*
Sitostanol	-2 \pm 3	2 \pm 4	-4 \pm 4
Campesterol	- 134 \pm 19*	-122 \pm 21*	-12 \pm 13
Sitosterol	-80 \pm 11*	-51 \pm 12*	-29 \pm 8*

* p<0,05 o menos

Las dos margarinas utilizadas en la prueba redujeron significativamente los niveles de campesterol y de sitosterol en el suero. Por otra parte, es un hecho bien conocido que la concentración de campesterol en el suero refleja la absorción intestinal de colesterol en el caso de seres humanos (29, 39). Por consiguiente, cuanto menor es el valor de campesterol, tanto menor es el porcentaje de colesterol absorbido en el intestino.

Las disminuciones significativas de los niveles de campesterol (25-28%) en el suero que se produjeron durante los periodos estudiados indican que las dos margarinas de éster de estanol disminuían la absorción intestinal de colesterol. Además, no se detectaron variaciones en la concentración de sitostanol en el suero mientras que la concentración media de campestanol en el suero era tras el período de éster de estanol de aceite vegetal considerablemente superior a la detectada durante la dieta casera y después del período de éster de estanol de talol. No obstante, la concentración absoluta de campestanol ascendía sólo a aprox. un 63% de la concentración del sitostanol, que suele considerarse generalmente como prácticamente inabsorbible. Esta concentración tan baja de campestanol en el suero indica claramente que la absorción de campestanol es muy limitada, contradiciendo este hecho los resultados presentados por Heinemann *et al.* (20). Por consiguiente y dado que las mezclas de estanoles con contenidos elevados de sitostanol suelen considerarse como no peligrosas para la ingestión humana, se puede concluir que las mezclas de estanoles con contenidos importantes de campestanol deben considerarse como igualmente seguras, teniendo en cuenta el hecho de que el campestanol es como el sitostanol prácticamente inabsorbible.

Los siguientes ejemplos de trabajo describen detalladamente la preparación de la composición de éster de estanol de la presente invención y de las margarinas utilizadas en los estudios clínicos presentados anteriormente.

Ejemplo 1

Hidrogenación de mezclas de esteroides

5 En un reactor a escala piloto (25 l) se hidrogenó una mezcla comercial de esteroides obtenidos a partir de destilados de aceite vegetal (composición de la mezcla: 2,7% de brasicasterol, 26,7% de campesterol, 18,4% de estigmasterol, 49,1% de sitosterol y 2,9% de sitostanol). Se alimentó el reactor con 26 g de un catalizador de Pd fibroso (Smop-20, contenido de Pd del 10% en peso, Smoptech, Turku, Finlandia), 26 g de agua destilada para activar el catalizador y 11,7 kg de propanol. Se inundó el reactor con nitrógeno y la activación del catalizador se realizó durante 30 min. bajo
10 gas de hidrógeno a una presión de 1 bar y a una temperatura de 65°C. Tras la activación, se enfrió la mezcla a 40°C y, a continuación, se agregaron 1,3 kg de la mezcla de esteroides.

La mezcla de esteroides y propanol se calentó a 65°C en una atmósfera de nitrógeno y, a continuación, se reemplazó el nitrógeno por hidrógeno. La reacción de hidrogenación se realizó a una presión de hidrógeno de 1 bar tras inundar completamente el reactor con hidrógeno. El tiempo de conversión normal es de aproximadamente 120 min. La conversión puede controlarse fácilmente analizando alícuotas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
15

Se disminuyó la presión de hidrógeno y se procedió a inundar el reactor con nitrógeno. Se extrajo el catalizador fibroso por filtración bajo presión de nitrógeno. Se dejó cristalizar la mezcla de estanoles y propanol a 10°C durante toda la noche, a continuación, se filtraron los cristales de estanol al vacío y se procedió a lavar la masa con 0,5 kg de propanol frío. Se secó la mezcla de estanoles así obtenida en una cámara de vacío a 60°C. El rendimiento obtenido era del 75%, presentando la mezcla de estanoles así obtenida la siguiente composición según los análisis por cromatografía de gases (CG) realizados con columna capilar: campesterol 0,2%, campestanol 28,9%, estigmasterol 0,1%, sitosterol 0,2%, sitostanol 70,1%. Debe señalarse que el brasicasterol se transforma por hidrogenación en 24β-metilcolestanol, un epímero de campestanol, que al presentar el mismo pico no puede distinguirse por su quiralidad en los procedimientos ordinarios de cromatografía de gases con columna capilar. Suele cuantificarse por tanto generalmente como campestanol. En base a la mezcla inicial de esteroides puede inferirse que el contenido de 24β-metilcolestanol ascendía al 2,7%.
25

Ejemplo 2

Preparación de ésteres de ácido graso de estanol

Se preparó a nivel experimental una mezcla de ésteres de ácido graso de estanol. A una temperatura de 60°C, se secaron durante toda la noche 6 kg de estanoles, que se obtuvieron combinando varios lotes producidos mediante el procedimiento de hidrogenación descrito en el ejemplo 1, y se procedió a esterificarlos con 8,6 kg de mezcla de ésteres metílicos de aceite de colza con bajos niveles de ácido erúico. La composición de esteroides de la mezcla de estanoles utilizada era la siguiente: 0,4% de campesterol, 29,7% de campestanol (+ 24β-metilcolestanol), 0,1% de estigmasterol, 0,4% de sitosterol y 68,0% de sitostanol. El contenido en estanol de la mezcla era del 98,2%. La esterificación se efectuó de la forma siguiente:
35

En un recipiente del reactor, se calentó una mezcla de estanoles y de éster metílico de ácido graso de aceite de colza con bajo contenido en ácido erúico a una temperatura de 90-120°C y en un vacío de 5-15 mmHg. Tras secarla durante 1 hora, se agregaron 21 g de etilato de sodio y se dejó que la reacción continuase durante aproximadamente 2 horas. Se destruyó el catalizador mediante la adición de 30% de agua (en peso) a 90°C. Tras la separación de fases, se extrajo la fase acuosa y se realizó un segundo lavado. Tras separar la fase acuosa, se procedió a secar la fase de aceite al vacío y a una temperatura de 95°C sometiéndola a una agitación de 200 rpm. A continuación, se blanqueó ligeramente la mezcla de ácidos grasos de estanol durante 20 min, a 3u0 mmHg y a una temperatura de 110°C con 1,0% de baño de blanqueo (Tonsil Optimun FF, Südchemie, Alemania), sometiéndola a una agitación de 200 rpm. Se eliminó por filtración la tierra de blanqueo, pudiéndose agregar entonces directamente la mezcla de ésteres metílicos de ácido graso y ésteres de ácido graso de estanol así obtenida a mezclas de grasas antes de proceder a la desodorización o a la extracción por destilación al vacío del exceso de ésteres metílicos. Se puede desodorizar seguidamente la mezcla a fin de obtener una mezcla insípida de ésteres de ácido graso de estanol que puede agregarse tal cual en distintos procedimientos de fabricación alimentarios.
45

La conversión del procedimiento de esterificación es normalmente > 99% según medidas realizadas mediante un método de HPLC rápida, siendo el rendimiento del orden del 95%.
50

Ejemplo 3

Producción de margarinas para los estudios clínicos

80% de las margarinas con ésteres de ácido graso de estanol de talol y ésteres de ácido graso de estanol basado en aceite vegetal se produjeron mediante un perfectador 3 x 57 a escala piloto de Gerstenberg & Agger. Los ésteres de ácido graso de estanol de talol se obtuvieron de la producción normal de margarina Benecol® de Ralsion Margariini, Finlandia. Se utilizó una mezcla normal de grasas libre de ácidos grasos trans (composición: 30% de grasa vegetal interesterificada y no hidrogenada y 70% de aceite LEAP líquido) a la que se agregaron mezclas de ácido graso de estanol. El contenido en estanol del producto final debía ascender a 12 g/100 g de producto, facilitándose así una
60

ES 2 220 986 T5

ingestión diaria de 3 g de estanol con un consumo diario de 25 g de producto. Los productos se elaboraron según la receta siguiente:

Mezcla de grasas que incluye los ésteres de ácido graso de estanol	80%
Agua	19%
Sal	0,5 %
Emulsionante, Dimodan BP	
Bicarbonato de sodio y ácido cítrico como agentes reguladores de pH	
β -carotenos como agente colorante	
Aromatizantes	

Las margarinas así obtenidas se envasaron en tarrinas de polipropeno de 250 g que se cerraron herméticamente con una lámina de aluminio. El sabor y la textura de los productos eran idénticos a los de las margarinas comerciales.

El contenido en estanol de la margarina de estanol de talol ascendía a 12,7 g/100 g de producto, mientras que el de la margarina de estanol basado en aceite vegetal era de 12,6 g/100g de producto. La composición de esteroides de estos dos productos era la siguiente:

	Margarina de estanol basado en talol	Margarina de estanol basado en aceite vegetal
Brasicasterol	0,3%	0,4%
Campesterol	2,2%	2,4%
Campestanol	7,5%	27,6%
Sitosterol	7,4%	4,2%
Sitostanol	82,5%	63,8%
Otros	0,1%	1,6%

Lista de referencias

Memorias de patentes norteamericanas

Ref. n°	
1	Eugster C, Haldemann W, Rivera G, <i>Sterols, their fatty acid esters and glucosides; processes for their preparation; spontaneously dispersible agents containing these compounds, and their use for treatment of tumors</i> (Esteroides, sus ésteres de ácido graso y glucósidos; procedimientos para prepararlos, agentes espontáneamente dispersibles que contienen estos compuestos, y uso de los mismos para el tratamiento de tumores), 1993, patente norteamericana n° 5.270.041.
2	Mieltinen TA, Vanhanen H, Wester I, <i>Use of stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level</i> (Uso de ésteres de ácido graso de estanol para reducir el nivel de colesterol en el suero), 1996, patente norteamericana n° 5.502.045.
3	Straub CD, <i>Stanols to reduce cholesterol absorption from foods and methods of preparation and use thereof</i> (Estanoles para reducir la absorción del colesterol de alimentos y procedimientos de

preparación y uso de los mismos), 1993, patente norteamericana n° 5.244.887.

- 4 *Clear cooking and salads oils having hypocholesterolemic properties* (Aceites puros de cocina y aceites para ensaladas que presentan propiedades hipocolesterolémicas), 1973, patente norteamericana n° 3.751.569.

Otras memorias de patentes

- 5 Baltes J, Merkle R, *Verfahren zur Herstellung eines Gemisches aus pflanzlichen und tierischen Ölen bzw. Fetten und Fettsäureestern* (Procedimiento para elaborar una mezcla de aceites o grasas vegetales y animales y ésteres de ácido graso), patente alemana DE 22 48 921.

Otras publicaciones

- 6 Armstrong MJ, Carey MC, *Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles* (Determinantes termodinámicos y moleculares en la solubilidad de esteroides en micelas de sal biliar), J. Lipid. Res., 1987; 28: 1144-1155.
- 7 Augustine RL, Reardon Jr. EJ, 1969, *The palladium catalyzed hydrogenation of cholesterol* (Hidrogenación de colesterol catalizada mediante paladio), Org. Prep. and Proced., 1969; 1: 107-109.
- 8 Backer M, Staab D, Von Bergmann K, *Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol* (Tratamiento con sitosterol y sitostanol de la hipercolesterolemia familiar grave durante la infancia) J. Pediatr., 1993; 122: 292-296.
- 9 Czubyko F, Beumers B, Lammsfuss S, Lütjohann D, von Bergmann K, *A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans* (Un microprocedimiento simplificado para la cuantificación de excreciones fecales de esteroides neutrales y ácidos en estudios con pacientes humanos no hospitalizados), J. Lipid Res., 1991; 32: 1861-1867.
- 10 Dayal B, Tnt GS, Batta AK, Speck J, Khachadurian AK, Shefer S, Salen G, *Identification of 5- α -stanols in patients with sitosterolemia anoxanthomatosis:*

5		<i>stereochemistry of the protonolysis of steroidal organoboranes</i> (Identificación de 5- α -estanoles en pacientes con sitosterolemia anoxantomatosis: estereoquímica de la protonólisis de organoboranos esteroidales), <i>Steroids</i> , 1982; 40: 233-243.
10	11	Dutta PC, Appelqvist LA, <i>Saturated sterols (stanols) in unhydrogenated and hydrogenated edible vegetable oils and in cereal lipids</i> (Esteroles (estanoles) saturados en aceites vegetales comestibles hidrogenados y no hidrogenados y en lípidos de cereales), <i>J. Sci. Food Agric.</i> 1996; 71: 383-391.
15		
20	12	Grundy SM, Mok HYI, <i>Effects of low dose phytosterols on cholesterol absorption in man</i> (Efectos de dosis reducidas de fitosteroles sobre la absorción de colesterol en el hombre) En: Greten H (Ed.) <i>Lipoprotein metabolism</i> (Metabolismo de lipoproteínas), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 112-118.
25		
30	13	Gylling H, Miettinen TA, <i>Serum cholesterol lowering by dietary sitostanol is associated with reduced absorption and synthesis of cholesterol and decreased transport of LDL apoprotein B in men with type II diabetes</i> (La disminución del colesterol en el suero mediante sitostanol dietético está asociada con una reducción en la absorción y en la síntesis del colesterol y con un menor transporte de LDL-apoproteína B en humanos con diabetes tipo II) En: Gotto Jr AM, Mancini M, Richter WO, Schwandt P (Eds.) <i>Treatment of severe dyslipoproteinemia in the prevention of coronary heart disease</i> (Tratamiento de dislipoproteinemia grave en la prevención de enfermedades coronarias del corazón), 4th Int. Symp., Munich, 1992, Karger, Basel, 1993: 57-59.
35		
40		
45		
50	14	Gylling H, Miettinen TA, <i>Serum cholesterol and cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic NIDDM patients before and during sitostanol ester-margarine treatment</i> (Colesterol en el suero y metabolismo de colesterol y lipoproteínas en pacientes NIDDM hipercolesterolémicos antes y durante el tratamiento con margarina de éster de sitostanol), <i>Diabetologia</i> , 1994; 37: 773-780.
55		
60	15	Gylling H, Siimes MA, Miettinen TA, <i>Sitostanol ester margarine in dietary treatment of children with familial hypercholesterolemia</i> (Margarina de éster de sitostanol en el tratamiento dietético de niños con
65		

	hipercolesterolemia familiar), J. Lipid Res., 1995; 36: 1807-1912.
5	
16	Hassan AS, Rampone AJ., <i>Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and β-sitostanol in the rat</i> (Absorción intestinal y transporte linfático de colesterol y β -sitostanol en ratas), J. Lipid Res., 1979; 20: 646-653.
10	
17	Heinemann T, Leiss O, von Bergmann K, <i>Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia</i> (Efecto de dosis reducidas de sitostanol sobre el colesterol en el suero de pacientes con hipercolesterolemia), Atherosclerosis, 1986; 61: 219-223.
15	
18	Heinemann T, Pietruck B, Kullack-Ublick G, von Bergmann K, <i>Comparison of sitosterol and sitostanol on inhibition of intestinal cholesterol absorption</i> (Comparación del sitosterol y sitostanol en la inhibición de la absorción intestinal de colesterol), Agents Actions (Supl), 1988; 26: 117-122.
20	
19	Heinemann T, Kullak-Ublick G-A, Pietruck B, von Bergmann K, <i>Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption</i> (Mecanismos de acción de los esteroides vegetales en la inhibición de la absorción de colesterol), Eur. J. Clin. Pharmacol., 1991; 40: 59-63.
25	
20	Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K, <i>Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man</i> (Comparación de la absorción intestinal de colesterol con distintos esteroides vegetales en el hombre), Eur. J. Clin. Invest., 1993; 23: 827-831.
30	
21	Ikeda I, Sugano M, <i>Comparison of absorption and metabolism of β-sitosterol and β-sitostanol in rats</i> (Comparación de la absorción y del metabolismo de β -sitosterol y β -sitostanol en ratas), Atherosclerosis, 1978; 30: 227-237.
35	
22	Ikeda I, Tanabe Y, Sugano M, <i>Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol</i> (Efectos del sitosterol y sitostanol sobre la solubilidad micelar del colesterol), J. Nutr. Sci. Vitaminol, 1989; 35: 361-369.
40	
23	Ikeda I, Kawasaki A, Samezima K, Sugano M,
45	
50	
55	
60	
65	

- 5 *Antihypercholesterolemic activity of β -sitostanol in rabbits* (Actividad antihipercolesterolémica del β -sitostanol en conejos), J. Nutr. Sci. Vitaminol, 1981; 27: 243-251.
- 10 24 Jandacek RJ, Webb MR, Mattson FH, *Effect of an aqueous phase on the solubility of cholesterol in an oil phase* (Efecto de una fase acuosa sobre la solubilidad del colesterol en una fase de aceite), J. Lipid Res., 1977; 18: 203-210.
- 15 25 Lees RS, Lees AM, *Effects of sitosterol therapy on plasma lipid and lipoprotein concentrations* (Efectos de terapias de sitosterol sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en el plasma) En: Greten H (Ed.) *Lipoprotein metabolism* (Metabolismo de lipoproteínas), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976: 119-124.
- 20 26 Lees AM, Mok HYI, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM, *Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance* (Esteros vegetales como agentes reductores de colesterol: pruebas clínicas con pacientes con hipercolesterolemia y estudios de balances de esteroides), *Atherosclerosis*, 1977; 28: 325-338.
- 25 27 Ling WH, Jones PJH, *Minireview dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects* (Minievaluación de fitosteroides dietéticos: Una evaluación de los metabolismos, beneficios y efectos secundarios), *Life Sciences*, 1995; 57: 195-206.
- 30 28 Mattson FH, Grundy SM, Grouse JR, *Optimizing the effect of plant esters on cholesterol absorption in man* (Optimización del efecto que presentan los esteroides vegetales sobre la absorción de colesterol en el hombre), *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982; 35: 697-700.
- 35 29 Miettinen TA, Koivisto P, *Non-cholesterol sterols and bile acid production in hypercholesterolaemic patients with ileal bypass* (Esteroides anticolesterol y producción de ácido biliar en pacientes hipercolesterolémicos con bypass biliar) En: Paumgartner G, Stiehl A, Gerok W (Eds.), *Bile acid and concentration in health and disease* (Ácido biliar y concentración de bilis en la salud y enfermedad) MTP Press, Boston, 1983: 183-187.
- 40 45 50 55 60 65

30	Miettinen TA, Vanhanen H, <i>Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes</i> (Sitostanol dietético relacionado con la absorción, síntesis y el nivel de colesterol en suero en distintos fenotipos de apolipoproteínas E) <i>Atherosclerosis</i> , 1994; 105: 217-226.
31	Miettinen TA, Puska P, Gylting H, Vanhanen H, Vartiainen E, <i>Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population</i> (Disminución de colesterol en el suero mediante margarina de éster de sitostanol en una población ligeramente hipercolesterolémica), <i>New Engl. J. Med.</i> , 1995; 333: 1308-1312.
32	Pollak OJ, <i>Effect of plant sterols on serum lipids and atherosclerosis</i> (Efecto de esteroides de plantas sobre los lípidos en el suero y la arterioesclerosis), <i>Pharmac. Ther.</i> , 1985; 31: 177-208.
33	Salen G, Ahrens Jr. EH, Grundy SM, <i>Metabolism of β-sitosterol in man</i> (Metabolismo del β -sitosterol en el hombre) <i>J. Clin. Invest.</i> , 1970, 49: 952-967; <i>J. Nutr. Sci. Vitaminol</i> , 1981; 27: 243-251.
34	Sugano M, Kamo F, Ikeda I, Morioka H, <i>Lipid-lowering activity of phytosterols in rats</i> (Actividad reductora de lípidos de fitostanoles en ratas), <i>Atherosclerosis</i> , 1976; 24: 301-309.
35	Sugano M, Morioka H, Ikeda I, <i>A comparison of hypocholesterolemic activity of β-sitosterol and β-sitostanol in rats</i> (Comparación de la actividad hipocolesterolémica del β -sitosterol y del β -sitostanol en ratas), <i>J. Nutr.</i> , 1977; 107: 2011-2019.
36	Vanhanen HT, Miettinen TA, <i>Effects of unsaturated and saturated dietary plant sterols on their serum contents</i> (Efectos de esteroides dietéticos saturados y no saturados de plantas sobre el contenido de los mismos en el suero), <i>Clin. Chim. Acta</i> , 1992; 205: 97-107.
37	Vanhanen HT, Blomqvist S, Enholm C, Hyvönen M, Jauhiala M, Torstila I, Miettinen TA, <i>Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with</i>

	<i>different apo E phenotypes during dietary sitostanol ester treatment</i> (Colesterol en el suero, precursores del colesterol, y esteroides vegetales en sujetos hipercolesterolémicos con distintos fenotipos de apolipoproteínas E durante un tratamiento dietético con éster de sitostanol), J. Lipid Res., 1993; 34:1535-1544.
38	Vanhanen HT, Kajander J, Lehtovirta H, Miettinen TA, <i>Serum levels, absorption efficiency, faecal elimination and synthesis of cholesterol during increasing doses of dietary sitostanol esters in hypercholesterolaemic subjects</i> (Niveles de colesterol en el suero, eficiencia de absorción, eliminación fecal y síntesis del colesterol en sujetos hipercolesterolémicos durante un tratamiento con dosis crecientes de ésteres de sitostanol dietético), Clin. Sci., 1994; 87: 61-67.
39	Tilvis RS, Miettinen TA, <i>Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption</i> (Esteroides vegetales en el suero y su relación con la absorción de colesterol), Am. J. Clin. Nutr., 1986; 43: 92-97

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de ésteres de ácido graso de estanol vegetal que comprende un éster de ácido graso de sitostanol y por lo menos 20% en peso de un éster de ácido graso de campestanol.
- 10 2. Composición de ésteres de ácido graso de estanol vegetal a usar como sustancia para reducir el nivel de colesterol en el suero, comprendiendo dicha composición un éster de ácido graso de sitostanol y por lo menos 20% en peso de un éster de ácido graso de campestanol.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, que comprende de 20% a 40% en peso de éster de ácido graso de campestanol.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 25% a 35% en peso de éster de ácido graso de campestanol.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende 30% en peso de éster de ácido graso de campestanol.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende de 50% a 80% en peso de éster de ácido graso de sitostanol.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar como tal para disminuir los niveles de colesterol en el suero.
- 25 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar como parte integrante de una dieta para reducir los niveles de colesterol en el suero.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar como parte integrante de una dieta que comprende un alimento que contiene grasas y permite disminuir los niveles de colesterol en el suero.
- 30 10. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para preparar un producto comestible.
11. Sustancia alimenticia que contiene una composición de ésteres de ácido graso de estanol vegetal que es eficaz en la disminución de los niveles de colesterol en el suero, comprendiendo dicha composición un éster de ácido graso de sitostanol y por lo menos 20% en peso de un éster de ácido graso de campestanol.
- 35 12. Sustancia alimenticia según la reivindicación 11, en la que dicha composición comprende de 20% a 40% en peso del éster de ácido graso de campestanol.
- 40 13. Sustancia alimenticia según la reivindicación 11 ó 12, en la que dicha composición comprende de 25% a 35% en peso del éster de ácido graso de campestanol.
14. Sustancia alimenticia según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicha composición comprende 30% en peso del éster de ácido graso de campestanol.
- 45 15. Sustancia alimenticia según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que dicha composición comprende de 50% a 80% en peso del éster de ácido graso de sitostanol.

50

55

60

65