

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE FARMACIA



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación del aceite de orujo de oliva en consumidores sanos  
y en población de riesgo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Susana González Rámila**

DIRECTORAS

María Laura Bravo Clemente

María Raquel Mateos Briz

Beatriz Sarriá Ruiz



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación del aceite de orujo de oliva en consumidores sanos  
y en población de riesgo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Susana González Rámila**

DIRECTORAS

María Laura Bravo Clemente

María Raquel Mateos Briz

Beatriz Sarriá Ruiz





# **AGRADECIMIENTOS**

El trabajo recogido en esta memoria se ha llevado cabo en el marco de varios proyectos de investigación, con referencia 20175429, 20184930, 20185194, 20193239, 20201315 y 20202485, financiados por la Interprofesional del Aceite de Orujo de Oliva (ORIVA). Asimismo, durante la realización de la Tesis Doctoral, su autora fue beneficiaria de un contrato predoctoral financiado por ORIVA.



*“Si es bueno vivir, todavía es mejor soñar, y lo mejor de todo,  
despertar”*

(Antonio Machado)



*A mi padre*







# **AGRADECIMIENTOS**



El mero hecho de comenzar a escribir este apartado supone asumir que este camino está llegando a su fin. Por ello, me gustaría dedicar unas breves palabras a todas aquellas personas que han formado parte de esta aventura. En primer lugar, me gustaría agradecer a todos los miembros de ORIVA por haberme hecho sentir una más de esa bonita familia olivarera. Gracias Alicia Vives, por tu cercanía, amabilidad y cariño. Del mismo modo, quiero agradecer a mis directoras de Tesis, Laura, Raquel y Bea, por haberme brindado la oportunidad de embarcarme en este viaje y convertirlo en una de las mejores etapas profesionales de mi vida. Gracias a las tres por vuestra profesionalidad, dedicación, cariño, y por transformar momentos “caóticos” en anécdotas divertidas. En definitiva, GRACIAS por todos estos años.

Además, estoy segura de que esta experiencia no hubiese sido igual sin mis super compañeros. Gracias David, Joaquín, Miguel, Rosa, Mónica, Sergio, Esther, Marta, Marisol, y todos aquellos estudiantes que han compartido con nosotros momentos que, sin duda, guardaré en mi memoria para siempre. Sois estupendos y espero teneros en mi vida por muchos años. Miguel, gracias por este último año y por haberme hecho tan feliz, ha sido todo un placer tenerte como compañero de batallas. También me gustaría agradecer a todo el personal del ICTAN por haberme acogido con los brazos abiertos desde el primer día, y por haber contribuido a que mi etapa en el ICTAN fuese inolvidable.

Por otra parte, también me gustaría dedicar un espacio a todas aquellas personas que, de una manera u otra, han aportado su granito de arena durante esta etapa. “Florecitas” gracias por vuestro apoyo incondicional durante todos estos años, y por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos. Gracias a toda mi gente de la escalada y el yoga, habéis sido mi refugio en los momentos más complicados y siempre os he sentido cerca cuando lo he necesitado. Gracias Mónica, por cuidarme como una “hermana” durante todos estos meses. Gracias a toda mi gente “covachera” por vuestro cariño, y en especial a Nerea, que ha vivido de cerca lo que es una Tesis Doctoral, y eso, une mucho. Y gracias a toda mi gente de “Estaca”, y en especial a Fabio, por esos paseos rehabilitadores y cargados de positividad.

Y como no, a mi familia. Gracias a mi hermano Imanol y a Marta, que durante esta etapa me han hecho tía de dos bellezas, Mikel y Maia. A mi querida madre que, aunque no estés entre nosotros, te tengo y te tendré presente en todos los momentos de mi vida. A mi querido padre, por ser mi gran pilar durante esta etapa y por estar siempre ahí cuando

te he necesitado. Mari, gracias a ti también por cuidarme y recibirme siempre con los brazos bien abiertos.

Y, por último, y no por ello menos importante, gracias Uri por tu paciencia (que reconozco ha sido mucha) y por tu apoyo incondicional durante esta etapa. Eres el mejor compañero de vida que podría haber escogido.



# ÍNDICE



Resumen .....	1
Summary .....	4
Índice de Tablas .....	7
Índice de Figuras .....	9
Abreviaturas .....	12
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1. Enfermedad cardiovascular y patologías asociadas. ....	19
1.1. Dislipemia .....	22
1.2. Hipertensión .....	24
1.3. Diabetes.....	25
1.4. Obesidad.....	26
2. Dieta y salud cardiovascular. La dieta mediterránea y el aceite de oliva como herramienta dietética frente a enfermedad cardiovascular .....	28
3. Aceite de orujo de oliva .....	33
3.1. Elaboración del aceite de orujo de oliva.....	33
3.2. Categorías de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva.....	38
3.3. Producción y consumo .....	39
4. Componentes del aceite de orujo de oliva.....	41
4.1. Ácido oleico .....	41
4.1.1. Definición y estructura química .....	41
4.1.2. Fuente e ingesta .....	41
4.1.3. Efectos en salud .....	42
4.2. Componentes minoritarios del aceite de orujo de oliva .....	43

4.2.1. Triterpenos pentacíclicos .....	43
4.2.2. Escualeno .....	50
4.2.3. Alcoholes grasos alifáticos .....	53
4.2.4. Fitoesteroles y tocoferoles .....	55
5. Potencial en salud del aceite de orujo de oliva .....	61
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
1. Aceites.....	73
2. Caracterización química de los aceites del estudio.....	73
3. Ensayos clínicos .....	74
3.1. Diseño de los estudios.....	74
3.2. Reclutamiento, aleatorización e intervención.....	75
4. Presión arterial .....	78
5. Medidas antropométricas.....	79
6. Tonometría arterial periférica.....	79
7. Cuestionarios .....	80
7.1. Valoración de la ingesta dietética .....	80
7.2. Análisis grado de aceptación de los aceites .....	81
8. Recolección de muestras sanguíneas .....	82
9. Determinaciones hematológicas y bioquímicas .....	82
10. Determinaciones de biomarcadores de función endotelial.....	83
11. Determinaciones de biomarcadores de inflamación .....	83
12. Determinación de capacidad antioxidante y daño oxidativo.....	84
12.1. Ensayo ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) .....	84
12.2. Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	85

12.3.Ensayo ABTS.....	86
12.4.Niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) .	86
12.5.Niveles de Malondialdehído (MDA) .....	87
13. Estadística .....	89
<b>RESULTADOS</b> .....	92
Artículo I.- Evaluación del efecto en salud del aceite de orujo de oliva en comparación con el aceite de girasol alto oleico en sujetos sanos y con riesgo cardiovascular. ....	95
1.1. Resumen.....	95
1.2. Artículo I.....	96
1.3. Resultados no publicados.....	118
1.3.1. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en biomarcadores de diabetes, obesidad y parámetros antropométricos. ....	118
1.3.2. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en la capacidad antioxidante y la peroxidación lipídica.....	129
1.3.3. Grado de aceptación del aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico. ....	132
Artículo II.- Evaluación del efecto en salud del aceite de orujo de oliva en comparación con el aceite de girasol en sujetos sanos y con riesgo cardiovascular. ....	134
2.1. Resumen.....	134
2.2. Artículo II.....	135
2.3. Resultados no publicados.....	166

2.3.1. Grado de aceptación del aceite de orujo de oliva y del aceite de girasol.....	166
Artículo III.- Evaluación del efecto en salud del aceite de orujo de oliva comparado con el aceite de girasol alto oleico y el aceite de girasol..	168
3.1. Resumen.....	168
3.2. Artículo III .....	169
3.3. Resultados no publicados.....	192
3.3.1. Efecto de la intervención nutricional sobre marcadores de diabetes y obesidad. ....	192
3.3.2. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en marcadores inflamatorios. ....	200
<b>DISCUSIÓN INTEGRADORA .....</b>	<b>205</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>221</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>226</b>



# Resumen

---

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en el mundo, siendo la dieta uno de los factores más relevantes en el desarrollo de esta patología. Un modelo de alimentación saludable como la dieta mediterránea es una herramienta fundamental para combatir la aparición y el desarrollo de enfermedades no transmisibles como ECV, diabetes u obesidad. El aceite de oliva, caracterizado por su alto contenido en ácido oleico y su variedad de moléculas bioactivas, es uno de los alimentos distintivos de la dieta mediterránea. Las propiedades beneficiosas en salud del aceite de oliva virgen y virgen extra, en particular en salud cardiovascular, han sido evidenciadas en numerosos estudios. Sin embargo, otras categorías de aceite de oliva, como el aceite de orujo de oliva (AOO), han sido poco exploradas.

El AOO se obtiene a partir del alpeorujo, constituido por los restos de piel, pulpa y hueso de la aceituna que quedan tras la obtención del aceite de oliva. El AOO se caracteriza por su alto contenido en ácido oleico y por su específica composición en componentes minoritarios, principalmente ácidos y dialcoholes triterpénicos, escualeno, tocoferoles, esteroides y alcoholes grasos alifáticos. Estudios *in vitro* y preclínicos realizados con algunos de estos componentes bioactivos han reportado propiedades cardioprotectoras, mejorando el perfil lipídico, la función endotelial, con efectos antihipertensivos, anti-inflamatorios y mejorando marcadores relacionados con diabetes y obesidad. Sin embargo, la inexistencia de ensayos clínicos con el AOO impide comprobar si lo observado en estos estudios se reproduce en humanos.

## Objetivo

Evaluar el efecto en salud cardiovascular y patologías asociadas (hipertensión, diabetes y obesidad) del consumo a dosis nutricionales de AOO en sujetos sanos y con riesgo moderado de padecer patologías cardiovasculares.

# Resumen

---

## **Materiales y métodos**

Se llevaron a cabo dos ensayos clínicos aleatorizados, cruzados, ciegos y controlados en un total de 65 adultos normocolesterolémicos y 67 moderadamente hipercolesterolémicos. Cada estudio tuvo una duración de 14 semanas, con dos fases de intervención de 4 semanas, precedidas por una etapa basal y de lavado, ambas de 3 semanas de duración. Como aceites control se empleó aceite de girasol alto oleico (AGAO) en el primer estudio y aceite de girasol (AG) en el segundo.

## **Resultados**

El estudio comparativo de ambas intervenciones reflejó que el consumo de AOO reducía significativamente los niveles séricos de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad unidas a colesterol (LDL-C), así como el perímetro de cintura en ambos grupos de población. Además, se observó una reducción de la oxidación lipídica (niveles de MDA) en sujetos sanos al comparar AOO y AGAO. En cambio, la ingesta de AG y AOO produjo un aumento significativo de Apo B y la relación Apo B/Apo A1, siendo menor la subida tras la ingesta de AOO. Asimismo, el AOO moduló positivamente diferentes marcadores relacionados con la diabetes, disminuyendo los niveles de insulina y mejorando indicadores de resistencia/sensibilidad a la insulina en sujetos sanos. La hormona leptina también experimentó un ligero aumento en el grupo hipercolesterolémico tras la ingesta de AOO. La presión arterial, la función endotelial y la inflamación no se vieron afectados en ningún caso.

## **Conclusiones**

El consumo de AOO produce efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular en individuos sanos y en sujetos moderadamente hipercolesterolémicos, mejorando el perfil lipídico y reduciendo el perímetro de cintura. Este efecto cardioprotector se vio reforzado en sujetos sanos por un menor daño oxidativo a lípidos y una disminución de la resistencia a la insulina. Por tanto, el consumo regular de AOO en la dieta puede ejercer beneficios en salud cardiometabólica.



# Summary

---

## Introduction

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. The diet is one of the most relevant factors involved in the development of this pathology. Following a healthy dietary pattern, such as the Mediterranean Diet, is a key tool for reducing the onset and development of non-communicable diseases such as cardiovascular disease, diabetes and obesity. A distinctive food in this dietary model is olive oil, characterized for its high oleic acid content and a wide variety of bioactive molecules. The health benefits of virgin and extra virgin olive oil, particularly their cardiovascular health benefits, have been demonstrated in numerous studies. However, other relevant categories of olive oil, such as olive pomace oil (OPO), have been less explored.

OPO is obtained from alperujo, a product consisting in the olives' pulp, skin and pits remaining after producing olive oil. OPO is characterised by its high oleic acid content and its specific composition in minor components, mainly triterpenic acids and dialcohols, squalene, tocopherols, sterols and aliphatic fatty alcohols. *In vitro* and preclinical studies with certain of OPO's components have reported cardioprotective properties through the modulation of lipid profile, improvement of endothelial function, induction of antihypertensive effects, reduction of inflammation levels and improvement of biomarkers related to the prevention of diabetes and obesity. However, the lack of clinical trials with OPO does not allow to confirm whether the findings from these studies are reproduced in humans.

## Objective

To assess the effects of the regular intake of OPO on cardiovascular health and associated pathologies (hypertension, diabetes and obesity) in healthy and moderated cardiovascular risk consumers.

# Summary

---

## Materials and methods

Two randomised, crossover, blind and controlled clinical trials were carried out in 65 normocholesterolaemic and 67 moderately hypercholesterolaemic adults. Both studies lasted 14 weeks and consisted of two four-week intervention phases, preceded by a three-week run-in or washout period. In the first study, OPO was compared with high oleic sunflower oil (HOSO) and in the second with sunflower oil (SO).

## Results

The comparative study of both nutritional interventions showed that OPO's consumption reduced serum levels of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), as well as the waist circumference in both population groups. In addition, lipid oxidation was reduced (MDA levels) in the healthy subject's when OPO was compared to HOSO. In contrast, SO and OPO intake led to a significant increase in Apo B and Apo B/Apo A1 ratio, this increase being less pronounced after OPO intake. Sustained OPO consumption also showed beneficial effects on the modulation of different diabetes-related markers, decreasing insulin levels and improving markers of insulin resistance/sensitivity in normocholesterolemic subjects. The hormone leptin was slightly increased in the hypercholesterolaemic group after OPO intake. Blood pressure and parameters measured to assess endothelial function and inflammation were not affected after dietary intervention with the OPO and the control oils (HOSO and SO).

## Conclusions

OPO consumption had beneficial effects on cardiovascular health in both healthy and moderately hypercholesterolaemic adults, decreasing serum levels of total cholesterol and LDL-C, and slightly reducing waist circumference. This cardioprotective effect was reinforced in healthy subjects by a lower oxidative damage to lipids and decreased insulin resistance. Therefore, regular intake of OPO in the diet may have beneficial effects in cardiometabolic health.



## Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en la glicemia, la insulinemia, la concentración de hemoglobina glicosilada, los índices de resistencia/sensibilidad a la insulina y en la función de células beta pancreáticas .....	119
<b>Tabla 2.</b> Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en biomarcadores de diabetes y obesidad .....	123
<b>Tabla 3.</b> Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en medidas antropométricos .....	127
<b>Tabla 4.</b> Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en capacidad antioxidante en suero y daño oxidativo a lípidos .....	130
<b>Tabla 5.</b> Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en la glicemia, la insulinemia, la concentración de hemoglobina glicosilada, los índices de resistencia/sensibilidad a la insulina y en la función beta pancreática .....	194



# Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Biomarcadores de inflamación en el proceso aterosclerótico .....	20
<b>Figura 2.</b> Moléculas que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis vascular .	21
<b>Figura 3.</b> Adipoquinas y citoquinas secretadas por el tejido adiposo.....	27
<b>Figura 4.</b> Tipos de extractoras (adaptado de MITECO, 2019).....	34
<b>Figura 5.</b> Proceso de refinación química del aceite de orujo de oliva .....	36
<b>Figura 6.</b> Flujos de biomasa del sector del aceite de oliva (Fuente: Berbel y col., 2018) .....	37
<b>Figura 7.</b> Procesos de obtención de las distintas categorías de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva .....	39
<b>Figura 8.</b> Estructura química del ácido oleico .....	41
<b>Figura 9.</b> Biosíntesis de los triterpenoides presentes en los frutos de <i>Olea europea</i> (Fuente: Stiti y cols., 2007) .....	44
<b>Figure 10.</b> Estructura química del ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido maslínico..	45
<b>Figura 11.</b> Estructura química del eritrodíol y uvol .....	46
<b>Figura 12.</b> Estructura química del escualeno.....	50
<b>Figura 13.</b> Estructura química del tetracosanol, hexacosanol, octacosanol y docosanol .....	54
<b>Figura 14.</b> Estructura química de $\beta$ -sitosterol .....	56
<b>Figura 15.</b> Estructura química del $\alpha$ -tocoferol.....	57
<b>Figura 16.</b> Diseño del estudio de intervención con aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol alto oleico (AGAO).....	74

## Índice de Figuras

---

<b>Figura 17.</b> Diseño del estudio de intervención con aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol (AG).....	75
<b>Figura 18.</b> Criterios de inclusión y exclusión establecidos en ambos estudios de intervención .....	76
<b>Figura 19.</b> Valoración del grado de aceptación de los voluntarios con el aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico.....	132
<b>Figura 20.</b> Valoración del grado de aceptación de los voluntarios con el aceite de orujo de oliva y el aceite de girasol.....	166
<b>Figura 21.</b> Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en biomarcadores de obesidad y diabetes.....	197
<b>Figura 22.</b> Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en la concentración de visfatina en sangre .....	199
<b>Figura 23.</b> Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en la concentración de leptina y grelina en sangre .....	200
<b>Figuras 24 y 25.</b> Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y acite de girasol en marcadores inflamatorios.....	201-202



## Abreviaturas

---

### A

ABC	Área bajo la curva
AAPH	2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro
ABTS	Ácido 2,2'-azobis (3-etilbenzotioazolina-6-sulfónico)
AG	Aceite de girasol
AGAO	Aceite de girasol alto oleico
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ALT	Alanina aminotransferasa
AM	Aceite de maíz
AO	Aceite de oliva
AOO	Aceite de orujo de oliva
AOR	Aceite de oliva refinado
AOV	Aceite de oliva virgen
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
Apo	Apolipoproteína
AST	Aspartato aminotransferasa

### C

CEIC	Comité ético de investigación clínica
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CT	Colesterol total

### D

DAD	Dectector de diodos en línea
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina

### E

ECV	Enfermedad cardiovascular
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EFSA	Autoridad europea de seguridad alimentaria
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial

# Abreviaturas

---

## F

FEDE	Federación española de diabetes
FRAP	Poder antioxidante/reductor del hierro

## G

G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT-2	Transportador de glucosa-2
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GSH	Glutati6n reducido

## H

HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDL-C	Colesterol de lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA)
HOMA-IR	Modelo homeostático para valorar la resistencia a la insulina
HOMA- $\beta$	Modelo homeostático para valorar la funcionalidad de las células $\beta$ pancreáticas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

## I

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IDH	Índice de dispersión de hematíes
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IFN- $\gamma$	Interfer6n gamma
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto nacional de estadística
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible

## L

LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL-C	Colesterol de lipoproteína de baja densidad
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidada
LnRHI	Transformación logarítmica con un límite coincidente del índice de hiperemia reactiva
LPL	Lipoproteína lipasa

## Abreviaturas

---

### M

MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MDA	Malondialdehído
MIP-1 $\beta$	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta
MITECO	Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico

### N

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear Kappa B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B)
NO	Óxido nítrico
NOX2	Isoforma 2 de la NADPH oxidasa

### O

OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

### P

PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAS	Presión arterial sistólica
PAT	Tonometría arterial periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
PLA2	Enzima fosfolipasa A2
PON	Paraoxonasa
PREDIMED	Estudio de prevención con dieta mediterránea

### Q

QUICKI	Índice de sensibilidad a insulina
--------	-----------------------------------

### R

RHI-PAT	Índice de hiperemia reactiva
ROS	Especies reactivas de oxígeno

## Abreviaturas

---

### S

SEM	Error estándar de la media
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SEQC	Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
s.f.	Sin fecha
SGLT-1	Transportador de glucosa dependiente de sodio
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción

### T

TE	Equivalente de Trolox
TEP	1,1,3,3- tetraetoxipropano
TG	Triglicéridos
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento tumoral beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
TPTZ	2,4,6-tri (2-piridil)-s-triazina
TRL	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

### U

UE	Unión Europea
UNH	Unidad de Nutrición Humana
USAS	Unidad de Servicio de Análisis Sensorial

### V

VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1
VCAM-2	Molécula de adhesión vascular-2
VCM	Volumen corpuscular medio
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VLDL-C	Colesterol de lipoproteína de muy baja densidad
VLDLr	Receptor de lipoproteína de muy baja densidad



# INTRODUCCIÓN



## 1. Enfermedad cardiovascular y patologías asociadas.

En el epígrafe de las enfermedades cardiovasculares (ECV) habitualmente se incluyen todos los trastornos del corazón y del sistema circulatorio, con sus numerosas formas de expresión clínica o fenotípica, como la aterosclerosis, el ictus, la enfermedad arterial periférica, las alteraciones del ritmo cardíaco, la insuficiencia cardíaca, las cardiopatías congénitas o las valvulopatías (Ugarte y cols., 2022). Según datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), en 2018 fallecieron en España como consecuencia de las ECV un total de 120.859 personas (el 53,7% mujeres y el 46,3% hombres), siendo la principal causa de muerte (explicando el 28,3% de todos los fallecimientos), seguida del cáncer (26,4%) y de las enfermedades respiratorias (12,6%) (INE, 2019).

Se sabe que las causas de la ECV se deben a múltiples factores, alguno de ellos invariables, como el sexo o los antecedentes familiares y, otros variables, que incluyen la edad, tabaquismo, actividad física insuficiente, hábitos dietéticos inadecuados, presión arterial elevada, obesidad, dislipemia y diabetes mellitus, entre otros. Por tanto, la identificación oportuna y el tratamiento adecuado de estas comorbilidades asociadas son fundamentales para combatir la ECV (Francula-Zaninovic y Nola, 2018; Ugarte y cols., 2022).

La **aterosclerosis** es una afección inflamatoria crónica basada en el endurecimiento y engrosamiento de las arterias, con pérdida de elasticidad. Cuando afecta a arterias de mediano y gran calibre con depósitos de placa de ateroma se denomina **aterosclerosis**. La aterosclerosis, considerada como la principal causa de ECV, es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares y que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente por células endoteliales, lípidos y tejido fibroso (Lahoz y Mostaza, 2007). Los cambios inflamatorios que acompañan al proceso aterogénico están mediados por la afluencia de células endoteliales (Frostegård, 2013). Cuando estas células propias del endotelio se activan, expresan la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), interleuquina (IL)-8, molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), E-selectina, P-selectina y otros factores inflamatorios, que atraen a su vez a

linfocitos y monocitos para unirse al endotelio e infiltrarse en la pared arterial, dando así comienzo a la inflamación. Muchas otras células y citoquinas también están involucradas en este proceso, como macrófagos, linfocitos (células T y B), células dendríticas, células del músculo liso vascular, IL, otras moléculas de adhesión o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Zhu y cols., 2018). Además, una gran cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se modifican a LDL oxidadas (LDLox) y se acumulan en la pared interna vascular, lo que contribuye al desarrollo de la placa de ateroma (Zhu y cols., 2018). Los monocitos se diferencian en macrófagos que engullen los depósitos de LDLox convirtiéndose en células espumosas (Lahoz y Mostaza, 2007; Frostegård, 2013). La acción concertada de todas estas señales proinflamatorias que operan en la placa no solo aumenta la inflamación, sino que también dificulta la renovación de los elementos estructurales que sustentan la estabilidad mecánica del tejido inflamado (Zhu y cols., 2018) (Figura 1).

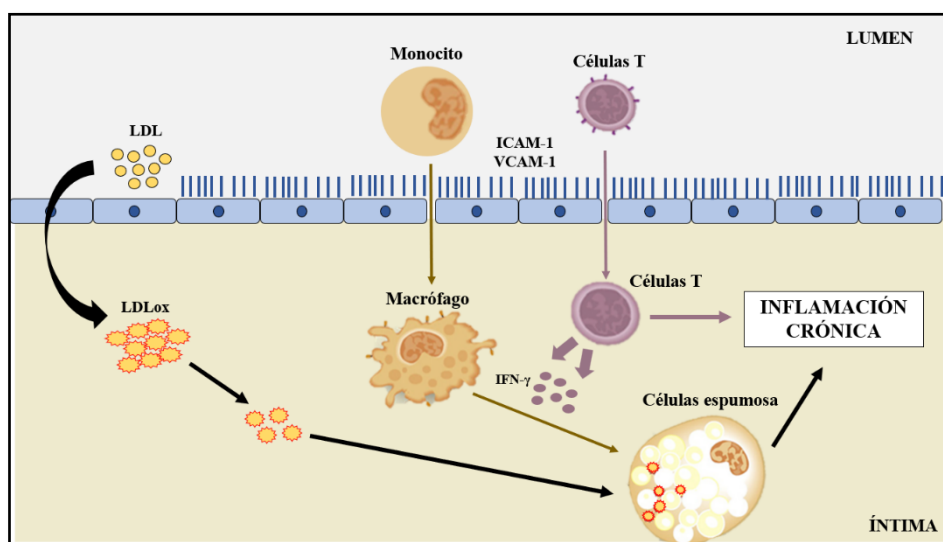


Figura 1. Biomarcadores de inflamación en el proceso aterosclerótico. LDL: lipoproteínas de baja densidad; LDL-ox: lipoproteína de baja densidad oxidada; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; IFN- $\gamma$ : interferón gamma; VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1.

Las células endoteliales sintetizan y liberan una gran variedad de sustancias vasoactivas que regulan el tono vascular, la presión sanguínea y el flujo sanguíneo local. La principal función del endotelio es la regulación del flujo sanguíneo sistémico y la perfusión tisular por medio de cambios en el diámetro de los vasos y en el tono vascular.

Este último es controlado mediante la producción de óxido nítrico (NO), prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), todos ellos factores vasodilatadores. Por el contrario, el estado vasoconstrictor es mediado por la producción de endotelina-1, angiotensina II y tromboxano A2 (Figura 2). En condiciones normales hay un balance entre las sustancias con propiedades vasodilatadoras, antitrombogénicas y antimitogénicas, y las sustancias con propiedades protrombóticas, proliferativas y vasoconstrictoras (Gimbrone y García-Cardena, 2016). Por tanto, se entiende como **disfunción endotelial** cuando se rompe este delicado balance y prevalece un estado vasoconstrictor, proinflamatorio, prooxidante, protrombótico y con características de adhesión provascular (Gimbrone y García-Cardena, 2016; Carvajal-Carvajal, 2017). Una de las sustancias vasodilatadoras más importantes producidas por las células endoteliales es el NO. La pérdida o disminución de la biodisponibilidad de esta sustancia es indicativo de una marcada disfunción endotelial. Por esta razón, el análisis de la capacidad vasodilatadora del NO, así como de otras moléculas que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis vascular, proporciona información sobre la integridad y la funcionalidad del endotelio (Carvajal-Carvajal, 2017; Fodor y cols., 2021) (Figura 2).

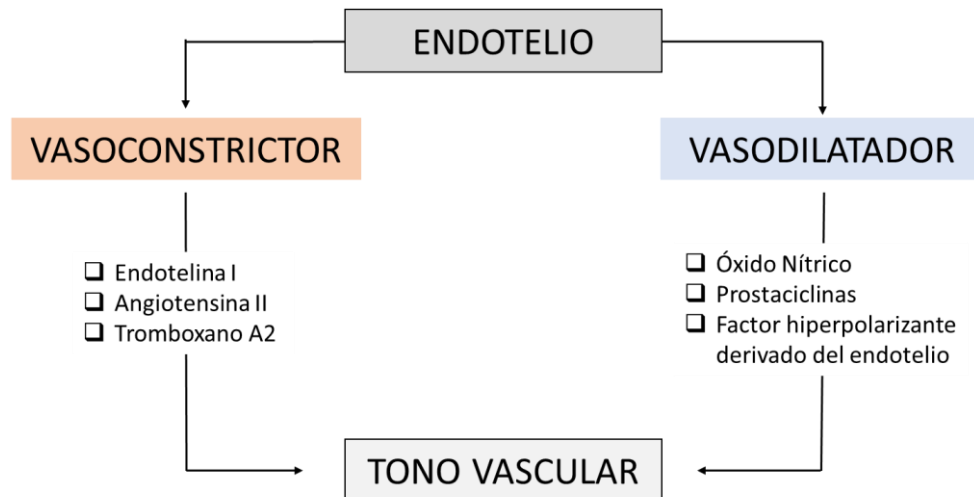


Figura 2. Moléculas que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis vascular.

Por tanto, la ECV se considera una enfermedad multifactorial en la que intervienen factores como la placa de ateroma, los procesos inflamatorios o la disfunción endotelial. Además, se sabe que la dislipemia, la hipertensión arterial, la diabetes o la obesidad son

enfermedades crónicas no transmisibles que aumentan el riesgo de sufrir un evento cardíaco. A continuación, dichas comorbilidades son descritas.

### 1.1. Dislipemia

Las lipoproteínas son partículas complejas que transportan lípidos (colesterol libre, colesterol esterificado, triglicéridos y fosfolípidos) y proteínas. Estas últimas se denominan "apolipoproteínas" (Apo) y se encuentran en la superficie de las diferentes partículas; su función es colaborar en la solubilización de las mismas y en la regulación de su transporte desde el lugar donde se absorben (intestino) o sintetizan (hígado), hasta el lugar donde se emplean (tejidos periféricos). Asimismo, participan en el procesamiento de las lipoproteínas, interviniendo en la activación o inhibición de diferentes enzimas implicadas en los procesos del metabolismo lipídico. El metabolismo de los lípidos se produce a través de dos vías: la exógena y la endógena (Vance y Vance, 2002; Traversa y Elbert, 2009).

En la vía exógena los triglicéridos de la dieta dan origen a los quilomicrones nacientes. Estas partículas se componen de triglicéridos (85-90%), colesterol esterificado, fosfolípidos y Apo B48. En su pasaje por el torrente sanguíneo, tras entrar en contacto con otras partículas, en especial con las lipoproteínas de alta densidad (HDL), adquieren otras lipoproteínas como la Apo CII, Apo CIII y Apo E. En el tejido adiposo y muscular son hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima sintetizada y secretada en estos tejidos. En condiciones normales la LPL favorece la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en los quilomicrones liberando ácidos grasos y formando el quilomicrón remanente. Los quilomicrones remanentes pierden cerca del 75-85% de los triglicéridos, aumentando la concentración de colesterol esterificado que, con intervención de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), es transferido desde otras lipoproteínas, principalmente desde las HDL. Finalmente, estos remanentes son captados por los receptores hepáticos para su degradación (Baynes y Dominiczak, 2009; Traversa y Elbert, 2009).

La vía endógena da origen a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), compuestas por Apo B100, fosfolípidos, triglicéridos y colesterol libre y esterificado que, en la circulación sanguínea, acoplan Apo CI, CII, CIII y Apo E a su estructura. Estas

partículas son también hidrolizadas por la LPL dando origen a lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) que, al unirse a los receptores LDL, pueden ser captadas por el hígado, o bien transformarse en LDL a través de una cascada en la que interviene la lipasa hepática (Baynes y Dominiczak, 2009).

La dislipemia se define como una anomalía metabólica que conduce a una alteración de las concentraciones plasmáticas de los lípidos, caracterizada por un aumento de las concentraciones circulantes de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), o una disminución de los niveles de colesterol HDL (HDL-C) (Trautwein y McKay, 2020). Atendiendo a la etiología de esta patología, la dislipemia puede clasificarse como primaria o secundaria. Se denomina primaria, cuando en su causa están implicados factores genéticos. Así, las dislipemias pueden ser monogénicas, producidas por la alteración de un sólo gen responsable del metabolismo lipídico, o poligénicas, si están producidas por la suma de los efectos de diferentes genes. Estas últimas son más frecuentes y menos severas que las monogénicas, y su expresión fenotípica está influenciada por factores ambientales (dieta, ejercicio, tabaquismo...). En el caso de la dislipemia secundaria, se presenta como consecuencia de la existencia de otras patologías subyacentes, como la obesidad o la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). El diagnóstico de dislipemia primaria exige haber descartado antes posibles causas de dislipemia secundaria, la mayoría de las cuales suelen evolucionar favorablemente con el tratamiento de la enfermedad causal (Verdú, 2009).

Como sucede con otros factores de riesgo cardiovascular, la prevalencia de la dislipemia en España es elevada. Un estudio transversal representativo de la población española, el Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA), reveló que el 50,5% de los adultos presentaron hipercolesterolemia ( $CT \geq 200$  mg/dL) y que en torno a un 44,9 % mostraron niveles elevados de colesterol unido a LDL (LDL-C) ( $\geq 130$  mg/dL). Asimismo, este mismo estudio reportó que el 23,2% de los hombres y el 11,7% de las mujeres evaluadas también mostraron niveles elevados de triglicéridos ( $\geq 150$  mg/dL) (Guallar-Castillón y cols., 2012).

La detección de la dislipidemia es una tarea complicada dado que es una enfermedad sin signos aparentes. De hecho, lo común es detectarla cuando se encuentra en una etapa avanzada, manifestándose entonces los síntomas derivados de las

complicaciones asociadas a la enfermedad, como la pancreatitis aguda o las enfermedades coronarias. Los tratamientos más habituales para atenuar esta enfermedad y corregir los niveles alterados del perfil lipídico consisten en la modificación de los hábitos dietéticos y la práctica regular de ejercicio físico. Cuando este método no es suficiente, se recurre al empleo de fármacos hipolipemiantes, como las estatinas o los secuestradores de ácidos biliares (Ascaso y Carmena, 2015).

## 1.2. Hipertensión

La presión arterial (PA) se define como la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias. Durante el ciclo cardíaco, la PA varía alcanzando (en cada ciclo) un valor máximo conocido como presión arterial sistólica (PAS) y un valor mínimo conocido como presión arterial diastólica (PAD). Se habla de hipertensión arterial cuando la PA está por encima de sus valores normales, alcanzando una PAS  $\geq 140$  mmHg o una PAD  $\geq 90$  mmHg (de la Sierra, 2019). La prevalencia de esta patología en la población española, según un estudio realizado por Menéndez y cols. (2016), es del 42,6%, lo que equivale a 16,5 millones de personas. Dicha prevalencia es superior en los hombres que en las mujeres (49,9% frente a 37,1%;  $p < 0,001$ ), especialmente en edades tempranas, ya que la prevalencia de esta patología aumenta claramente con la edad.

La hipertensión arterial puede producirse por causa específica, que representa en torno al 10% de los casos y está ocasionada principalmente por la enfermedad renal crónica o renovascular, o ser de etiología desconocida, que representa alrededor del 90% de los casos y está producida por anormalidades humorales que afectan al sistema renina-angiotensina-aldosterona, por resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, desregularización de las moléculas endoteliales que mantienen la homeostasis vascular, o por la elevada ingesta de sodio, entre otros (Wells y cols., 2015).

El tratamiento de la hipertensión arterial generalmente comienza con terapia no farmacológica y medidas dietéticas, que incluyen restricción del consumo de sal en las comidas, control del peso en pacientes obesos, moderación de la ingesta de alcohol, práctica de ejercicio aeróbico regular y abandono de la práctica de fumar. Cuando estas medidas no son suficientes se aplica el tratamiento farmacológico (Wells y cols., 2015; Labrador y cols., 2017).

### 1.3. Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, como resultado de defectos en la secreción de la insulina, habitualmente por destrucción de las células beta pancreáticas de origen autoinmunitario en la DM tipo 1 (DM1), o una progresiva resistencia a la acción periférica de la insulina, con o sin déficit asociado en la secreción, en la DM2. En ambos casos, el desarrollo de esta enfermedad se atribuye a una combinación de factores genéticos predisponentes, así como a una serie de factores ambientales que actúan como desencadenantes (Ruiz-Ramos y cols., 2006). La DM puede originar una serie de complicaciones agudas (cetoacidosis y coma hiperosmolar) o crónicas, tanto microvasculares (retinopatías y neuropatías) como macrovasculares (cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares y vasculares periféricas) (Ezquerro y cols., 2008). Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado de manera vertiginosa en los últimos años, alcanzando los 422 millones de personas diabéticas en el año 2014 (Lovic y cols., 2020).

Existe una fuerte asociación entre la diabetes y las ECV, constituyendo la causa más común de mortalidad entre los adultos diabéticos, con un 52% de las muertes en la DM2 y un 44% en la DM1 (Huang y cols., 2017). Además, recientemente se ha demostrado que los estados prediabéticos, caracterizados por la alteración de la glucemia en ayunas o la alteración de la glucosa, también están asociados con una mayor morbilidad y mortalidad por ECV (Huang y cols., 2017). Otros factores de riesgo, como la hipertensión, la dislipemia o la obesidad, también son comunes en este grupo de población (Ezquerro y cols., 2008).

Por ello, el tratamiento no farmacológico de esta patología está orientado a reducir los niveles de glucosa en sangre (considerado el fenómeno principal) y mejorar aquellas condiciones ambientales, como la obesidad o la hipertensión, que favorecen el estado hiperglucémico de estos sujetos. Así, en la educación diabetológica, tanto las recomendaciones nutricionales como el ejercicio físico son pilares fundamentales en el manejo de la DM. Cuando estos tratamientos no son eficaces, se recurre a la insulina o a los antidiabéticos orales (Reyes-Sanamé y cols., 2016).

#### 1.4. Obesidad

La obesidad es considerada como un trastorno crónico caracterizado por un acúmulo excesivo de grasa corporal como consecuencia de un ingreso calórico superior al gasto energético del individuo. Se considera que la etiología de esta enfermedad es multifactorial, ya que intervienen factores biológicos, psicosociales, socioeconómicos, ambientales y genéticos (Verdú, 2009; Powell-Wiley y cols., 2021). Además, según la distribución del depósito de grasa en el cuerpo, la edad de aparición y las complicaciones metabólicas asociadas, se han definido diferentes formas fenotípicas de obesidad. Según datos reportados por el INE, en el año 2020 el 16,5% de los hombres adultos y el 15,5% de las mujeres adultas padecían obesidad en España (INE, s.f). El ascenso progresivo de esta patología indica la necesidad de diseñar estrategias de actuación encaminadas a la detección de individuos de riesgo, diagnóstico temprano y abordaje integral del problema (Márquez Díaz, 2016).

Debido a la dificultad que supone la cuantificación de la grasa corporal en la práctica clínica, se ha incorporado el índice de masa corporal (IMC) como marcador para indicar el grado de adiposidad del paciente (Verdú, 2009). No obstante, a nivel individual se cuestiona el uso de este índice, ya que el porcentaje de grasa puede ser muy variable en función del sexo, la edad, la raza/etnia del paciente, o los niveles de aptitud cardiovascular (Gadde y cols., 2018). Por ello, otros métodos como la bioimpedancia eléctrica o las mediciones antropométricas (los pliegues cutáneos o los perímetros corporales) están siendo aplicados para determinar con mayor exactitud la distribución y el porcentaje de grasa corporal (Powell-Wiley y cols., 2021).

El tejido adiposo blanco representa el principal depósito de grasa y es considerado el mayor órgano endocrino secretor de adipoquinas y citoquinas sistémicamente. Las adipoquinas (como es el caso de la leptina) están involucradas en diversas cascadas de señalización metabólica y fisiológica, regulan la señalización de la insulina, la captación de glucosa, la oxidación de ácidos grasos, así como otros procesos metabólicos y de producción de energía. Por otra parte, las citoquinas (como por ejemplo las interleuquinas) actúan fundamentalmente como reguladoras de las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Tanto el aumento de peso como la obesidad provocan cambios fenotípicos en el tejido adiposo blanco y, en consecuencia, adipocitos inflamados

y disfuncionales. Estas células adiposas segregan, tanto a nivel local como sistémico, citoquinas proinflamatorias que, a su vez, alteran el funcionamiento normal del tejido adiposo, así como el de los órganos remotos. Desde este punto de vista, el tejido adiposo es considerado un órgano inmune y secretor, y la obesidad una enfermedad inmune inflamatoria (Kawai y cols., 2021) (Figura 3).

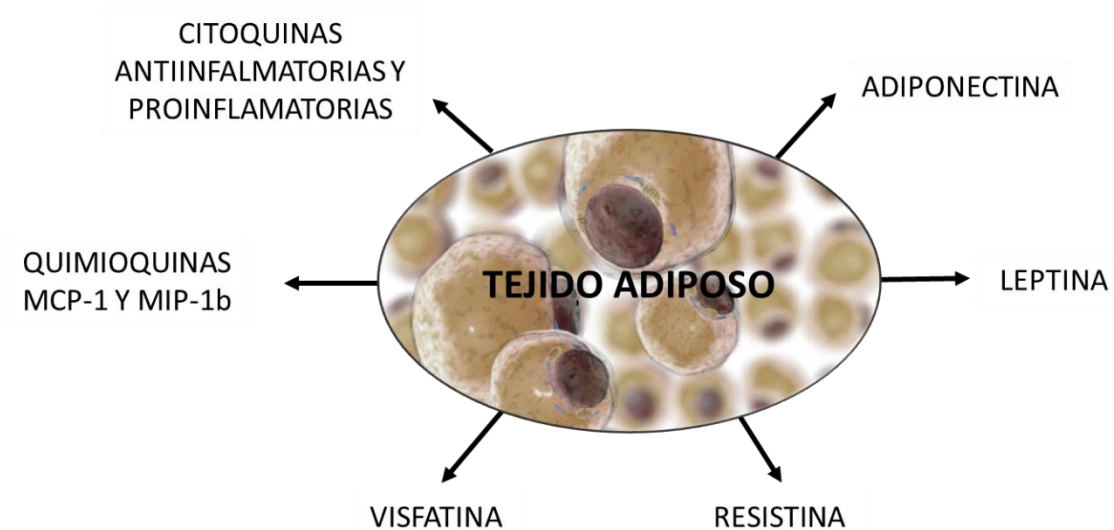


Figura 3. Adipoquinas y citoquinas secretadas por el tejido adiposo. MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; MIP-1 $\beta$ : proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta.

## **2. Dieta y salud cardiovascular. La dieta mediterránea y el aceite de oliva como herramienta dietética frente a enfermedad cardiovascular**

En línea con lo descrito en la sección anterior, se puede afirmar que la ECV no es una enfermedad subyacente, sino que con frecuencia está acompañada de otros factores de riesgo como la hipertensión, niveles elevados de azúcar en sangre, exceso de peso o hipercolesterolemia. A pesar de los avances terapéuticos, la creciente incidencia de la ECV subraya la necesidad de incorporar estrategias eficaces para prevenir y modificar el curso de esta enfermedad tan extendida (Lacroix y cols., 2017). En este sentido, se ha evidenciado que el tratamiento dietético representa una herramienta eficaz en el manejo de la ECV y sus factores de riesgo (Ravera y cols., 2016). Entre los diferentes patrones dietéticos, la dieta mediterránea está considerada como uno de los mejores modelos de alimentación saludable, caracterizada por su riqueza en ácidos grasos monoinsaturados (AGM), fibra dietética, compuestos antioxidantes y una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6. La principal fuente grasa de la dieta mediterránea es aceite de oliva (AO), considerado como un símbolo distintivo de este modelo dietético (Lacroix y cols., 2017). Su grasa preferentemente monoinsaturada y su riqueza en compuestos fenólicos (en particular en el aceite de oliva virgen (AOV) o el aceite de oliva virgen extra (AOVE)) han relacionado el consumo regular de esta grasa con un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (Yubero-Serrano y cols., 2019). A continuación, se detallan los efectos del AO, en concreto la categoría de AOVE, sobre ECV, sobre la dislipemia, hipertensión, diabetes y obesidad.

Numerosos estudios epidemiológicos han evidenciado que el patrón de dieta mediterránea, que incluye AOVE, está asociado con un menor riesgo de ECV y mortalidad en individuos con alto riesgo de padecer eventos cardiovasculares (Nocella y cols., 2018). El efecto cardioprotector de la dieta mediterránea fue reportado por primera vez en un estudio epidemiológico conocido como “Estudio de los Siete Países”, que estableció una menor incidencia por ECV en poblaciones mediterráneas consumidoras de AO (Keys y cols., 1966). En los últimos años, el exitoso estudio de intervención PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea) ha demostrado que el consumo de AO, en concreto de AOVE, está asociado con un menor riesgo de eventos cardiovasculares y mortalidad en población mediterránea con un alto riesgo

cardiovascular. En este mismo ensayo se reportó que el incremento de 10 g/día de AOVE (no con el AO común) reducía en un 10% la probabilidad de sufrir un evento coronario (Guasch-Ferré y cols., 2014).

En un principio, los efectos beneficiosos del AO sobre la salud fueron asociados a su alto contenido en ácido oleico (C18:1), un ácido graso monoinsaturado que proporciona a las membranas celulares la fluidez adecuada para facilitar su funcionalidad, sin aumentar su inestabilidad. Sin embargo, a pesar de este buen perfil de AGM presente en el AO, las evidencias más recientes sugieren que los compuestos minoritarios, fundamentalmente de naturaleza fenólica, son los principales responsables de los efectos preventivos y terapéuticos del AOV/AOVE (Sánchez-Rodríguez y cols., 2018).

Entre las propiedades beneficiosos del AOVE, su papel frente al estrés oxidativo, dada la implicación de éste en el desarrollo de enfermedades ateroscleróticas, ha sido extensamente estudiado. Así, en el estudio EUROLIVE (efecto del consumo de AO sobre el daño oxidativo en las poblaciones europeas), donde los participantes fueron asignados aleatoriamente a tres grupos de AO (25 mL/día) que diferían en su contenido fenólico (bajo: 2,7 mg/kg, medio: 164 mg/kg, y alto: 366 mg/kg), observaron un menor daño oxidativo a lípidos de forma lineal con el aumento del contenido fenólico tras tres semanas de intervención (Cicero y cols., 2008). La reducción de las concentraciones plasmáticas de marcadores de peroxidación lipídica, en concreto LDLox, también fue observada en dos ensayos clínicos de larga duración (1 año) desarrollados en sujetos con alto riesgo cardiovascular tras la ingesta de dietas ricas en AOVE en comparación con el grupo control (dieta baja en grasas) (Fitó y cols., 2014; Hernáez y cols., 2017).

Asimismo, el consumo a corto plazo de AOVE también ha demostrado modular la actividad antioxidante o el daño oxidativo a macromoléculas en diversos ensayos en humanos. En este sentido, Pérez-Martínez y cols. (2010) demostraron que el consumo de una dieta mediterránea, rica en AOVE, reducía los niveles postprandiales de biomarcadores de estrés oxidativo como los peróxidos lipídicos, las proteínas carboniladas o los niveles plasmáticos de peróxido de hidrógeno, en comparación con una dieta rica en ácidos grasos saturados (AGS), aumentando los niveles del antioxidante endógeno glutatión reducido (GSH). Del mismo modo, en un estudio postprandial, la suplementación de la dieta mediterránea con 10 g de AOVE produjo una mejora de los biomarcadores de estrés oxidativo analizados postprandialmente [especies reactivas de

oxígeno (ROS) e isoprostanos como 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  -III en plaquetas, entre otros] en comparación con la dieta control, a través de la regulación negativa de la isoforma 2 de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (NOX2) (Carnevale y cols., 2014).

El efecto protector de esta grasa vegetal frente a la oxidación también fue respaldado por un informe emitido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre el efecto protector del consumo de AO rico en compuestos fenólicos (5 mg de hidroxitirosol) y sus derivados secoiridoideos en la prevención de la oxidación de las LDL-C (EFSA, 2011).

Además del estrés oxidativo, la disfunción endotelial se considera otro acontecimiento crucial en el desarrollo de la aterosclerosis y su gravedad es un factor determinante del riesgo de recurrencia cardiovascular. Se sabe que para un correcto funcionamiento del endotelio es esencial mantener una adecuada vasodilatación y un metabolismo regular de diferentes moléculas que están implicadas en el daño endotelial (Frostegård y cols., 2013). El efecto del consumo prologado de AOVE sobre biomarcadores de función endotelial ha sido evaluado en diversos ensayos clínicos. Así, se ha descrito que el consumo de 50 mL/día de AOVE durante 1 año, ejerce un efecto reductor sobre las moléculas de adhesión celular ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina, que participan en los procesos de adhesión y migración de células mononucleares hacia la pared arterial (Casas y cols., 2014). Del mismo modo, dos estudios clínicos desarrollados en sujetos con alto riesgo cardiovascular (Medina-Remón y cols., 2015) y moderadamente hipertensos (Storniolo y cols., 2017), también reportaron efectos beneficiosos sobre la función endotelial al observar una mayor expresión de NO (considerado como un potente vasodilatador) tras la ingesta regular de AOVE.

La alteración del correcto funcionamiento de la pared arterial también está relacionada con el desarrollo de patologías como la dislipemia o la hipertensión arterial. En este sentido, varios estudios de intervención dietética han demostrado una asociación positiva del contenido polifenólico del AO con la respuesta del perfil lipídico (Yubero-Serrano y cols., 2019). De la misma forma, un reciente ensayo clínico desarrollado en pacientes sometidos a angiografía coronaria (prueba para examinar el corazón) observó una reducción de los niveles plasmáticos de LDL-C tras la ingesta de 25 mL/día de AOVE

en comparación al grupo control que consumió la misma cantidad de AO (25 mL/día) (Khandouzi y cols., 2021).

La hipertensión es uno de los problemas crónicos de salud más comunes en la población y, por ello, numerosos estudios han centrado su investigación en conocer el comportamiento de distintos componentes de la dieta, como el AO, sobre este factor de riesgo cardiovascular. Una reciente revisión bibliográfica realizada por Massaro y cols. (2020), en la que se evaluaron los diversos ensayos realizados en humanos con AO y su efecto sobre la presión arterial, concluyó que el AOVE ejerce un efecto antihipertensivo y, por consiguiente, puede ser una buena elección como fuente grasa en los protocolos de tratamiento de la hipertensión, tanto en pacientes sanos como en aquellos con riesgo cardiovascular.

Por último, como se ha señalado anteriormente, la DM2 y la obesidad son otras de las patologías asociadas al desarrollo de trastornos del corazón y del sistema circulatorio. Sin embargo, a diferencia del resto de enfermedades descritas previamente, el efecto del AO sobre la DM2 y la obesidad ha sido menos explorado (Sánchez-Rodríguez y cols., 2018). En relación con la diabetes, el estudio PREDIMED demostró que la dieta mediterránea suplementada con AOVE reducía el riesgo de DM2 en un 40% en sujetos con alto riesgo cardiovascular, disminuía la glucosa plasmática (en ayunas) y mejoraba la resistencia a la insulina en individuos diabéticos (Lasa y cols., 2014). Esta mejora del perfil glucémico también fue recogida en un ensayo clínico desarrollado en pacientes diagnosticados con DM2, donde la administración diaria de 25 mL de AOVE redujo los niveles plasmáticos de glucosa y hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Santangelo y cols., 2016). Sin embargo, cuando la población de estudio fueron sujetos sanos, hubo menos unanimidad en los resultados. Así, mientras Visioli y cols. (2015) observaron un descenso en los valores postprandiales de glucosa en sangre tras la administración de 10 g de AOVE, Covas y cols. (2006) no observaron ningún efecto en las concentraciones séricas de glucosa tras la administración de AO con distinto contenido fenólico. Con respecto a la obesidad, diversos ensayos clínicos desarrollados en pacientes con alto riesgo cardiovascular (Estruch y cols., 2019) y diabéticos (tipo 2) (Santangelo y cols., 2016) observaron un descenso en el IMC, perímetro de cintura y peso corporal tras la administración de 25 mL/día de AOVE.

En resumen, son múltiples las evidencias científicas que avalan el uso del AOV/AOVE como herramienta preventiva en patologías crónicas como la ECV, dislipemia, hipertensión, diabetes y obesidad, entre otras, situando a esta fuente grasa como una de las más recomendadas para el mantenimiento de la salud. Sin embargo, otros tipos de aceite derivados del olivo han sido mucho menos estudiados, a pesar de su interés nutricional por su alto contenido en ácido oleico y la presencia de otros componentes minoritarios en la fracción insaponificable, con potenciales propiedades beneficiosas en salud. A continuación, se tratará con detalle el aceite de orujo de oliva (AOO), objeto de la presente Tesis Doctoral.

### 3. Aceite de orujo de oliva

#### 3.1. Elaboración del aceite de orujo de oliva

Para definir la materia prima que se emplea en la elaboración del AOO, es necesario remontarse a la cadena de producción del AO que tiene lugar en las almazaras. En los últimos años, el sistema de producción de AO ha experimentado importantes cambios con el objetivo de aumentar la productividad, disminuir el impacto medioambiental y reducir los costes de producción y el consumo de agua. Como consecuencia, se ha producido un cambio tanto en la composición como en los subproductos generados en las almazaras (Fernández y cols., 1995).

El proceso de obtención del AO comienza con la recolección de las aceitunas. El sistema empleado para la recolecta será aquel que ocasione una menor rotura de la piel de la oliva, así como un menor daño al olivo (Civantos, 1999). Una vez recogidas, son transportadas a las almazaras para ser procesadas con la mayor brevedad posible, con el propósito de ralentizar su posible deterioro. A continuación, se eliminan todas las impurezas (ramas, hojas y piedras) y se lavan las olivas. Una vez limpias y escurridas se transportan al molino, donde tendrá lugar la molturación de la aceituna. Este paso, clave en la obtención del AO, es necesario para triturar totalmente la aceituna y liberar el aceite contenido en los tejidos vegetales de este fruto (Marchal y cols., 2011).

La pasta que se obtiene tras la molturación presenta una estructura que no favorece la posterior extracción de aceite por dos razones: el pequeño tamaño de las gotas de aceite y la existencia de microgeles (formados por restos de tejidos y agua) que retienen dichas gotas (Marchal y cols., 2011). Para corregir esta situación, la pasta se deposita en una batidora dotada con sistemas de calefacción y paletas que permiten la agregación de las gotas de grasa y la ruptura de los geles (Civantos, 1999; Marchal y cols., 2011).

En la actualidad, el sistema más extendido en el sector olivarero para la obtención del AO es el de dos fases, donde se genera por un lado el AO en sus tres categorías y, por otro lado, el orujo graso húmedo o alpeorujo, con un contenido de humedad del 50-70% (Gullón y cols., 2020). Con este sistema, además de reducir el consumo de agua, se evita la generación de subproductos (como los alpechines), con el consiguiente beneficio medioambiental (Fernández y cols., 1995).

El alpeorujo u orujo graso húmedo, constituido por hueso, pulpa y piel de la aceituna, representa el 80% de la aceituna molturada y supone la principal materia prima de las extractoras o plantas orujeras encargadas de producir AOO (Sánchez-Moral y Ruíz-Méndez, 2006).

La extracción del aceite a partir del orujo graso húmedo puede seguir diferentes vías: bien el alpeorujo se somete a una segunda extracción (conocido como extracción por medios físicos o en frío, Tipo A de la Figura 4) (Sánchez-Moral y Ruíz-Méndez, 2006), o bien se reduce la humedad mediante el paso del orujo graso húmedo por tambores de secado hasta generar el orujo graso seco (Tipo B de la Figura 4). El calor necesario para esta fase de secado se obtiene de la combustión del orujillo o hueso de la aceituna, producto generado también en las extractoras, o mediante sistemas de cogeneración con gas natural (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico MITECO, 2019).

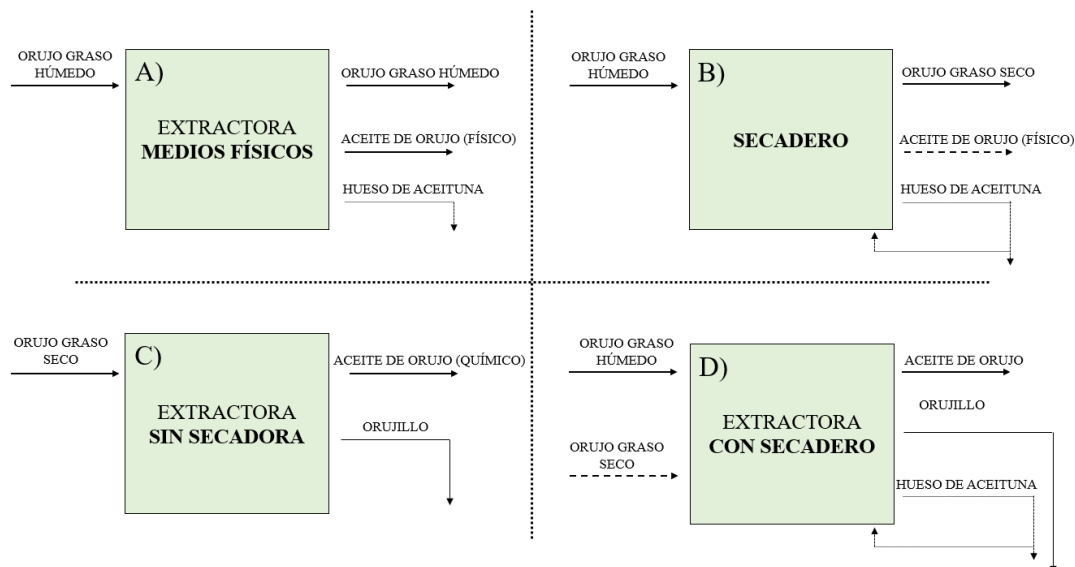


Figura 4. Tipos de extractoras (adaptado de MITECO, 2019).

La extracción del aceite de orujo crudo a partir del orujo graso seco se realiza mediante procedimientos químicos con la ayuda de disolventes orgánicos (hexano) (Modelo C, Figura 4). En la actualidad, existen dos sistemas de extracción química: discontinua y continua. En ambos sistemas se carga el aparato extractor con el orujo desecado y se añade hexano (Sánchez-Moral y Ruíz-Méndez, 2006).

En los dos sistemas de extracción química se obtiene por un lado el aceite con hexano, que constituye la miscela, y por otro lado el orujo lixiviado (Vega, 2016). Este último, al igual que sucede con la miscela, también contiene disolvente orgánico (hexano). Por tanto, el siguiente paso consiste en eliminar el hexano presente tanto en el aceite, para obtener aceite de orujo crudo, como en el orujillo, para poder ser utilizado como biomasa en las propias plantas extractoras. Mientras que en las miscelas el disolvente orgánico se elimina mediante un proceso de filtrado y destilación, el hexano presente en el orujo lixiviado es retirado por medio de un proceso de evaporación. Este disolvente recuperado es reutilizado por las extractoras (Sánchez-Moral y Ruíz-Méndez, 2006).

Finalmente, otro tipo de extractoras (Modelo D, Figura 4) realizan la extracción de aceite de orujo crudo combinando alguno de los procesos citados anteriormente, es decir, someten a un secado el orujo graso húmedo para posteriormente extraer el aceite por medios tanto físicos (o en frío) como químicos (MITECO, 2019).

Una vez extraído el aceite de orujo crudo de la pasta semisólida, que representa alrededor del 2% del total, este aceite es destinado a la refinería, cumpliendo así con la normativa vigente, que establece que la extracción y el refinado deben realizarse en distintas instalaciones (Real Decreto nº 760/2021). La refinación del aceite de orujo crudo se realiza para adecuarlo a unas determinadas características de acidez, color, olor y sabor, para que resulte agradable al consumidor y no afecte a la estabilidad del aceite (Ruíz-Méndez y cols., 2010; Vega, 2016).

El proceso de refinación consta de varias etapas: desgomado, neutralización, winterización, decoloración y desodorización (Figura 5) (Antonopoulos y cols., 2006; Ruíz-Méndez y cols., 2010). La primera etapa de desgomado tiene como finalidad la eliminación de fosfolípidos mediante la adición de agentes hidratantes (Ruíz-Méndez y cols., 2010). A continuación, se trata con una solución alcalina (sosa caustica) para precipitar los ácidos grasos libres (como los jabones) y eliminar los restos de fosfolípidos. Durante la winterización, se procede al enfriamiento y posterior filtración/centrifugación del aceite neutro para eliminar aquellos compuestos que precipiten a temperatura ambiente, como son las ceras o los triglicéridos saturados (Ruíz-Méndez y cols., 2010). En la etapa de decoloración, se emplea tierra de blanqueo o carbón activo para eliminar

los pigmentos naturales, los productos de oxidación, las trazas de metales y algún que otro contaminante orgánico como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Antonopoulos y cols., 2006). La desodorización es el último paso realizado en el proceso de refinación, donde el aceite pretratado se calienta hasta alcanzar la temperatura de desodorización (180-270 C°) mediante intercambio de calor y vapor directo (Antonopoulos y cols., 2006) (Figura 5).

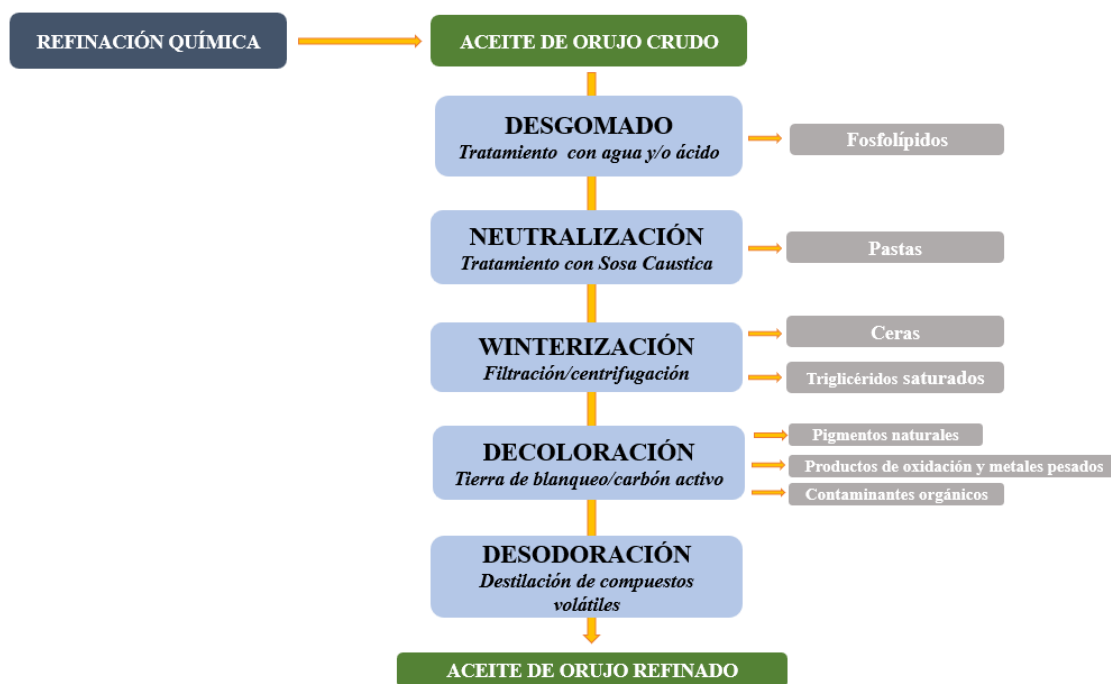


Figura 5. Proceso de refinación química del aceite de orujo de oliva.

El aceite de orujo de oliva refinado se destina a las envasadoras, donde se añade AOV o AOVE para dotarlo tanto de características organolépticas como nutritivas (por la incorporación de compuestos fenólicos, por ejemplo). Este procedimiento es conocido como “encabezado” o “cupaje” y da como resultado el AOO definido según los reglamentos CEE 356/92 y CE 1513/2001 como un “*aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría*”.

Por último, es de interés resaltar que tanto el alpeorujo como otros residuos del sector olivarero, incluyendo las hojas y la biomasa generada tras la poda y el

mantenimiento de los olivos, o tras la limpieza de las aceitunas en la almazara, así como los huesos, incluidos los generados en la industria de la aceituna de mesa, o el orujillo obtenido en las extractoras, son también aprovechados íntegramente. Así, usos como la obtención de energía térmica, producción de bioetanol, biodiesel, metano, pellets, etc. son algunos de los posibles destinos de la biomasa de hojas, restos de poda o hueso, tanto para uso industrial como doméstico (Manzanares y cols., 2017; Berbel y cols., 2018; Gullón y cols., 2020). En menor medida son empleados también para la producción de piensos y compost (Consejería de Agricultura y Pesca-Junta de Andalucía, 2015). En la Figura 6 se esquematizan los flujos de biomasa en el sector olivarero

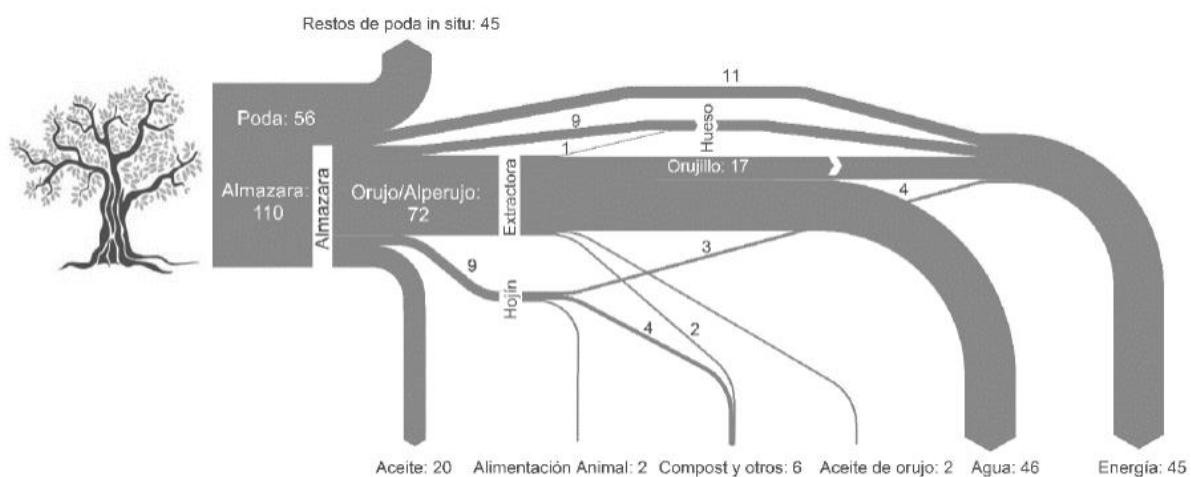


Figura 6. Flujos de biomasa del sector del aceite de oliva (Fuente: Berbel y cols., 2018).

Además, tanto las hojas y restos de poda, como el hueso o el propio alperujo tienen un alto contenido en sustancias orgánicas como carbohidratos, polifenoles, lípidos y proteínas (Ruiz-Méndez y cols., 2013). Por ello, a partir de ellos se extraen productos de alto valor añadido, principalmente compuestos fenólicos como oleuropeína o hidroxitirosol, con un gran potencial en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Vogel y cols., 2014; Şahin y Bilgin, 2018; Gullón y cols., 2018; 2020; García Martín y cols., 2020). Por tanto, el sector del olivar es un claro ejemplo de economía circular e impacto medioambiental nulo, al que contribuye de manera fundamental la obtención del AOO.

### 3.2. Categorías de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva

Las distintas categorías de aceite de oliva se clasifican de acuerdo a parámetros de calidad basados en sus características fisicoquímicas (como el grado de acidez), el índice de peróxidos, el contenido en ácidos grasos, la composición en esteroides, las características organolépticas o la ausencia de defectos organolépticos, conforme a lo establecido en el Reglamento (CEE) nº 2568/91. Atendiendo a estos parámetros, se distinguen las siguientes categorías de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva (Figura 7) (Comisión Europea, s.f):

- Aceite de oliva virgen extra (AOVE): se considera la categoría de mayor calidad. En el plano organoléptico, carece de defectos y presenta un sabor afrutado. No debe contener una acidez superior al 0,8%.
- Aceite de oliva virgen (AOV): puede presentar algún defecto sensorial, pero poco relevante. La acidez no debe ser superior al 2%.
- Aceite de oliva virgen lampante: se trata de un AOV con una calidad inferior, que presenta una acidez superior al 2% y no cuenta con caracteres afrutados ni defectos sensoriales importantes. Este aceite de oliva no se destina a la comercialización en el mercado minorista. Este aceite es refinado o puede ser empleado con fines industriales.
- Aceite de oliva refinado (AOR): es el producto obtenido tras el refinado de un AOV defectuoso (por ejemplo, aceite de oliva lampante). Presenta un grado de acidez de hasta el 0,3% y, al igual que el aceite de oliva lampante, no está destinado a la venta al por menor.
- Aceite de oliva (AO): es un aceite obtenido a partir de la mezcla de aceite de oliva refinado con aceite de oliva virgen extra y/o virgen. Contiene un grado de acidez de hasta el 1%.
- Aceite de orujo de oliva crudo: Es el aceite resultante de la pasta residual obtenida tras la extracción del aceite procedente de las aceitunas.
- Aceite de orujo de oliva refinado (AOO): es el producto obtenido de refinar el aceite de orujo de oliva crudo y encabezado con aceites de oliva vírgenes. Su grado de acidez puede alcanzar hasta el 1%.

Sin embargo, no todas estas categorías pueden venderse directamente a los consumidores. Solo el AOVE, AOV, AO y AOO pueden comprarse directamente al por menor, según lo establecido en el Reglamento (CE) n°1019/2002 que regula las normas de comercialización del aceite de oliva (Figura 7) (Comisión Europea, s.f).

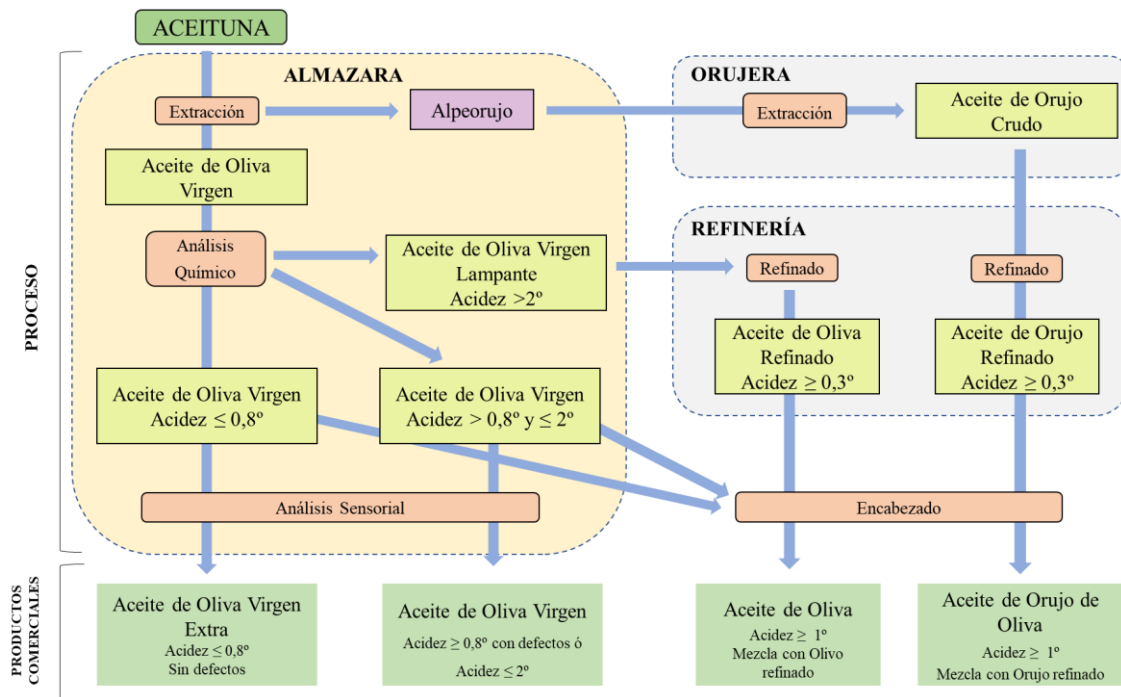


Figura 7. Procesos de obtención de las distintas categorías de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva

### 3.3. Producción y consumo

El aceite más consumido a nivel mundial es el aceite de palma, seguido del aceite de soja, colza y girasol (Murcia, 2010). Países superpoblados consumidores de estas variedades de aceite, como Malasia, Indonesia, China, India o Estados Unidos, son la razón de su alto consumo. En los últimos años, la globalización en el comercio de los aceites vegetales y de semillas está experimentando cambios como respuesta a la demanda de los clientes, a las variaciones económicas y al cumplimiento de regulaciones y políticas apropiadas. Las preferencias dietéticas, la sostenibilidad y todos aquellos aspectos vinculados con la salud, conforman algunas de las demandas por parte de los consumidores (Joe, 2018).

En este contexto, el AO es un claro ejemplo de internacionalización. Las características organolépticas propias del AOV y AOVE, así como las propiedades beneficiosas en salud atribuidas al consumo regular de esta fuente grasa justifican que el consumo a nivel mundial de este aceite haya experimentado un aumento del 91,1% desde 1990 (Consejo Oleico Internacional, 2021). Los principales consumidores de AO son Grecia, España, Chipre y Portugal. Según datos reportados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, s.f), España lidera la producción de este aceite tanto en la Unión Europea (UE) (70% producción) como a nivel mundial (45% producción).

Como se mencionaba anteriormente, en el proceso de producción de AO se generan elevadas cantidades de alpeorajo, que se destina principalmente a la obtención de AOO. Por ello, España también lidera la producción de AOO, con un 59% del total de la producción y el 71% de la comercialización mundial (MAPA, s.f).

Sin embargo, a diferencia del AO, su consumo en nuestro país está menos arraigado, y es por esta razón que en torno al 83% del AOO es exportado. Los principales destinos de exportación en la campaña 2020/2021 fueron Italia (18%), Estados Unidos (11%), Portugal (10%), Emiratos Árabes (6%), México (5%), China (4%), Reino Unido (4%) e India (2%) (Asociación Nacional de Empresas de Aceite de Orujo, 2021). De acuerdo con los datos proporcionados por el MAPA, en el año 2021, el consumo medio per cápita de AOO en la población española fue de 0,1 kg (MAPA, 2021). Estos datos corroboraron la poca adherencia en los hogares españoles al AOO si se compara con el consumo de otras categorías de AO (AOR: 4 kg/año; AOVE: 3 kg/año, AOV: 0,7 kg/año), o con el consumo de aceite de girasol (3,4 kg/año) y de semillas (0,3 kg/año) (MAPA, 2021).

## 4. Componentes del aceite de orujo de oliva

### 4.1. Ácido oleico

#### 4.1.1. Definición y estructura química

El ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) (C18:1) es un AGM con un peso molecular de 282,5 g/mol, constituido por 18 moléculas de carbono, con un doble enlace en el carbono 9, y con un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo hidroxilo (OH) en cada extremo (Figura 8). Cuando el ácido palmítico y el ácido esteárico se desaturan (por acción de la  $\Delta 9$ -desaturasa), se producen varias reacciones de elongación y desaturación que dan lugar al ácido oleico (Mataix y Gil, 2004).

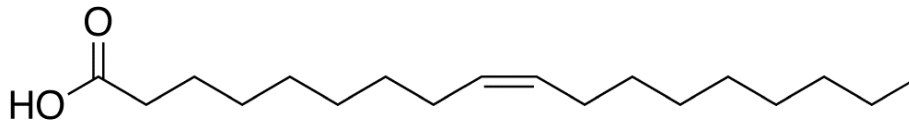


Figura 8. Estructura química del ácido oleico.

#### 4.1.2. Fuente e ingesta

Los AGM están presentes en una amplia gama de alimentos, como algunas frutas (aceitunas y aguacate), frutos secos, aceites de semillas, carnes y productos lácteos. El ácido oleico constituye el principal ácido graso de la dieta, presente en grandes cantidades en los aceites de oliva (56-85%), aceite de canola (56-70%) y en la mayoría de los frutos secos (9-60%). Además de estas fuentes bien conocidas, al menos un 30 % de los ácidos grasos que contiene el sebo de vaca, la manteca de cerdo y el aceite de palma son ácido oleico. Por último, los aceites de soja y maíz contienen una proporción de ácido oleico de más del 20% (Ros y cols., 2015).

Las recomendaciones de ingesta de AGM en Europa oscilan, en términos generales, entre un 10 y un 20% de la energía total de la dieta (22-45 g/día). En el caso de España, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) recomienda que la ingesta media de AGM alcance el 20% de la energía total de la dieta (en torno a 45 g/día). Sin embargo,

en base a los beneficiosos resultados obtenidos en el estudio PREDIMED, la ingesta recomendada de AGM para la población española puede situarse en el 20-25% de la energía diaria (45-55 g/día), siempre que la principal fuente grasa sea el AOVE (Arija y cols., 2015; Ros y cols., 2015).

#### 4.1.3. Efectos en salud

Las acciones protectoras de la ingesta regular de ácido oleico sobre parámetros relativos a la salud, en particular sobre la salud cardiovascular, han sido asociadas con un alto consumo de AGM derivados de la ingesta regular de aceite de oliva (Sales-Campos y cols., 2013). En este sentido, el exitoso estudio prospectivo de cohortes PREDIMED demostró que la ingesta de AGM estaba asociada a un menor riesgo de ECV y muerte por eventos cardiovasculares, reduciendo la incidencia de éstos en un 30%. Estos resultados fueron observados en aquellos participantes asignados a una dieta mediterránea sin restricciones energéticas complementada con AOVE (Estruch y cols., 2018). Por tanto, aunque los AGM son el componente mayoritario del AOVE, otros compuestos minoritarios bioactivos, como los polifenoles, podrían haber contribuido a los resultados observados tanto en este como en otros estudios desarrollados con este aceite vegetal (Yubero-Serrano y cols., 2019).

Para clarificar si los efectos beneficiosos del aceite de oliva están relacionados con el contenido en polifenoles (como el hidroxitirosol) o en ácido oleico, Pastor y cols. (2021) realizaron una extensa revisión sistemática y meta-análisis de los distintos ensayos desarrollados en humanos con este compuesto y su relación con dislipemia o distintas patologías como diabetes o hipertensión, entre otras. Así, los artículos recogidos en esta revisión relacionaron el consumo de ácido oleico con una mejora del perfil lipídico, en concreto en CT y LDL-C. Esta observación también fue reportada en otra revisión realizada por Joris y Mensink (2016), quienes apuntaron a que los AGM tenían un efecto favorable sobre el perfil lipoproteico sérico cuando se comparaban con grasas saturadas y un efecto similar cuando eran comparadas con el ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico. En lo que respecta a la homeostasis glucídica, se ha demostrado que la sustitución en la dieta de una grasa saturada por ácido oleico mejora la sensibilidad a la insulina. Sin embargo,

queda por esclarecer cual es el mecanismo que explique el posible efecto protector del ácido oleico en la DM2 (Palomer y cols., 2018).

La presión arterial ha sido otro parámetro evaluado en algunos ensayos para comprobar el posible efecto hipotensor del consumo regular de este ácido. A este respecto, los resultados son algo controvertidos; mientras algunos estudios han asociado el consumo de ácido oleico con efectos beneficiosos sobre la presión arterial (Waterman y Lockwood, 2007), otros no han encontrado ninguna relación (Pastor y cols., 2021). Por último, el ácido oleico también ha sido relacionado con propiedades beneficiosas en enfermedades como el cáncer de mama o la artritis reumatoide, al inhibir mecanismos proinflamatorios, con una menor expresión de oncogenes (*Her-2nev*) y moléculas de adhesión que participan en el desarrollo de estas patologías (Sales-Campos y cols., 2013; Pastor y cols., 2021).

## **4.2. Componentes minoritarios del aceite de orujo de oliva**

Además del ácido oleico, el AOO contiene un amplio rango de componentes minoritarios en su fracción insaponificable que pueden contribuir positivamente al mantenimiento de la salud. Los principales componentes identificados son los ácidos y dialcoholes triterpénicos, escualeno, alcoholes grasos alifáticos, tocoferoles y esteroides. El contenido en compuestos fenólicos en el AOO es mínimo en comparación con el AOVE y AOV como consecuencia del proceso de refinado del AOO. Por esta razón, los compuestos fenólicos no han sido tratados en esta sección.

### **4.2.1. Triterpenos pentacíclicos**

#### **4.2.1.1. Definición y estructura química**

Los *terpenos* derivan de unidades de isopreno C<sub>5</sub> y, según el número de unidades de isopreno, los terpenos se clasifican como hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) y tetraterpenos (C<sub>40</sub>). Por tanto, los triterpenoides pentacíclicos están constituidos por 30 moléculas de carbono agrupadas en ciclos de cinco o seis carbonos con diferentes sustituyentes (Furtado y cols., 2017). Los triterpenos se sintetizan a través de la vía citoplasmática de acetato/mevalonato a partir del acetyl-CoA, el cual se transforma en

unidades de isopreno activo. La condensación de seis moléculas de isopreno activo y un precursor común, (3S)-2,3-escualeno u oxidoescualeno, da lugar a los triterpenos (Fernández-Aparicio y cols., 2019). El oxidoescualeno sirve como sustrato de numerosas oxidoescualeno ciclasas como la  $\beta$ -amirina sintasa. Esta enzima cataliza la conversión de oxidoescualeno en  $\beta$ -amirina, precursor del eritrodíol, ácido oleanólico y ácido maslínico. De igual forma, la  $\alpha$ -amirina será el precursor del uvaol y el ácido ursólico (Stiti y cols., 2007) (Figura 9). Los principales compuestos triterpénicos identificados en la fracción minoritaria del AOO son los ácidos oleanólico, maslínico y ursólico, y los alcoholes eritrodíol y uvaol (Mateos y cols., 2020).

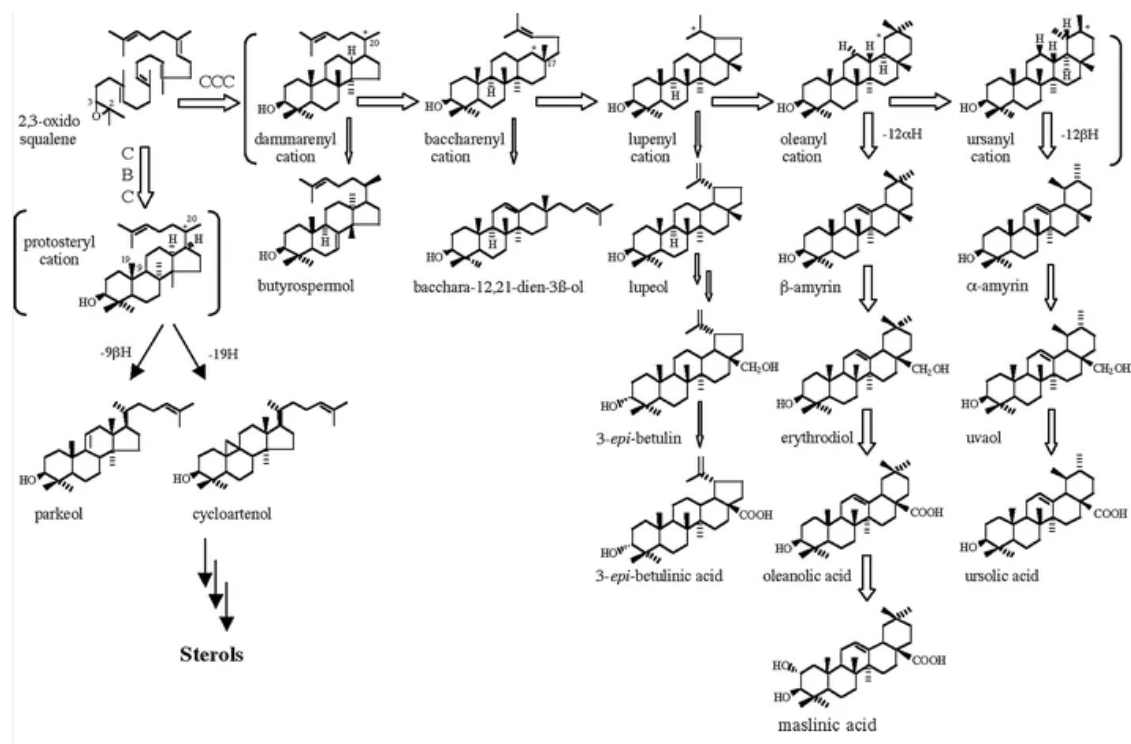


Figura 9. Biosíntesis de los triterpenoides presentes en los frutos de *Olea europaea* (Fuente: Stiti y cols., 2007).

El ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-olea-12-en-28-oico, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>) presenta un peso molecular de 456,7 g/mol y está compuesto por 5 anillos de seis carbonos con un grupo carboxilo en el carbono 28 y un grupo beta-hidroxilo en la posición 3. Se biosintetiza a partir de lupino y puede reorganizarse en su isómero, ácido ursólico, u oxidarse en taraxasterol y  $\beta$ -amirina (Castellano y cols., 2022) (Figura 10). Su isómero,

el *ácido ursólico* (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-oico, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>), tiene un peso molecular de 456,7 g/mol y deriva de un hidruro de ursano (Luna-Vázquez y cols., 2016) (Figura 10). Con relación al *ácido maslínico* (ácido (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-2,3-dihidroxiolean-12-en-28-oico, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>) está compuesto también por cinco anillos de seis carbonos que posee dos sustituyentes hidroxilo en los carbonos 2 y 3, un grupo carboxilo en el carbono 28 y un doble enlace sobre los carbonos 12-13 (Figura 10). Tiene un peso molecular de 472,7 g/mol y, al igual que el ácido oleanólico, deriva de un hidruro de oleanano (Liu y cols., 2007) (Figura 10).

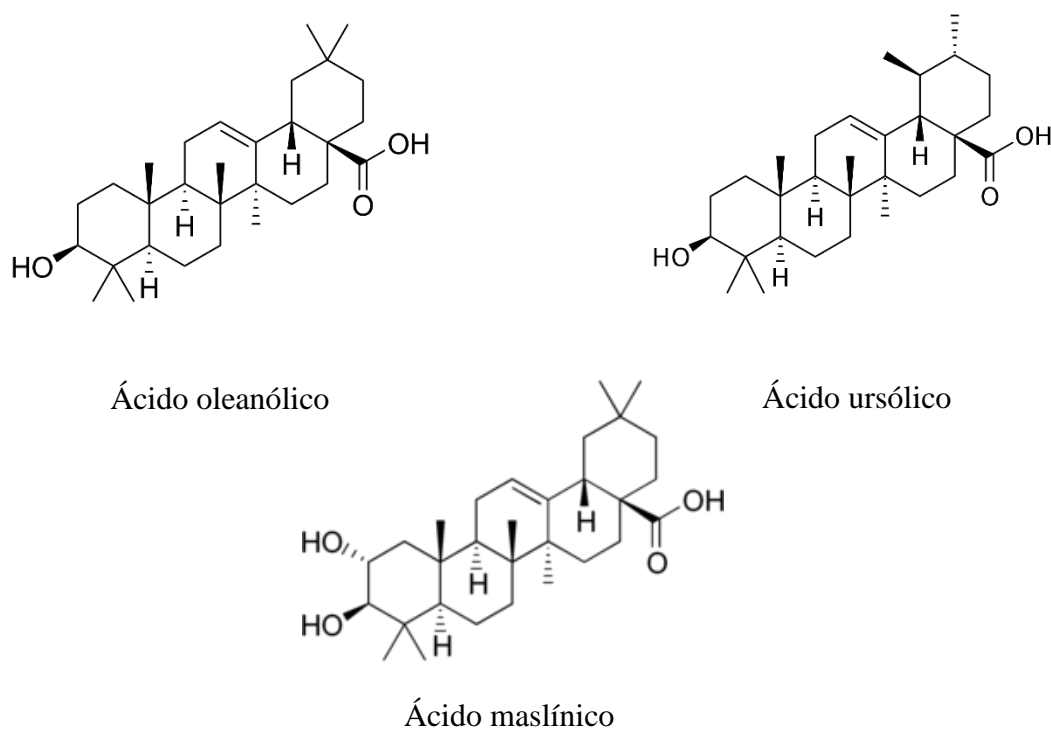


Figura 10. Estructura química del ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido maslínico.

El *eritrodiol* ((3 $\beta$ )-olean-12-en-3,28-diol, C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>) está compuesto por 30 átomos de carbono con un grupo metilo en el carbono 20 y dos grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 17. Deriva de una  $\beta$ -amirina y presenta un peso molecular de 442,7 g/mol. Por último, el *uvaol* (12-ursen-ene-3 $\beta$ ,28-diol, C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>) presenta una estructura química similar al eritrodiol con la diferencia de que el grupo metilo está localizado en el carbono 19. Tiene un peso molecular de 442,7 g/mol y deriva de un hidruro de ursano (Allouche y cols., 2010; Abuobeid y cols., 2020) (Figura 11).

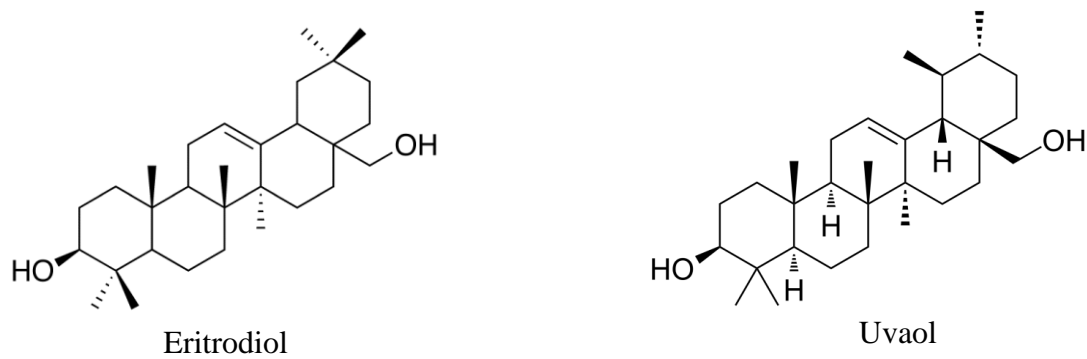


Figura 11. Estructura química del eritrodiol y uvaol.

#### 4.2.1.2. Fuente e ingesta

Los triterpenos pentacíclicos se encuentran en varias plantas medicinales y son componentes naturales de la dieta humana, pues se han encontrado en una gran variedad de frutas, aceites vegetales y cereales. En particular, estos compuestos están presentes en las plantas de la familia *Oleaceae*, como es caso del olivo (*Olea europea*) (Furtado y cols., 2017). El contenido medio de los triterpenos pentacíclicos varía según las diferentes categorías de aceite de oliva. Así, en el AOV y AVOE el contenido de ácidos y dialcoholes triterpénicos es de 90-200 mg/kg y <200 mg/kg, respectivamente. En el caso del AOO, el contenido de alcoholes triterpénicos oscila entre 200 y 1000 mg/kg, con una concentración <200 mg/kg de ácidos triterpénicos (Mateos y cols., 2020).

Con respecto a la ingesta, hasta ahora no se han recogido datos que informen del consumo medio de triterpenos pentacíclicos en la población. Tampoco existen recomendaciones dietéticas para estos compuestos biológicamente activos. No obstante, teniendo en cuenta que estos triterpenos están presentes en los aceites procedentes de la aceituna, es probable que el consumo medio de ácidos y dialcoholes triterpénicos sea mayor en los países consumidores de aceite de oliva.

#### 4.2.1.3. Efectos en salud

Los triterpenos pentacíclicos propios del AOO han sido relacionados con una amplia gama de actividades farmacológicas por su papel en la prevención de ECV y factores de riesgo asociado, modulando el perfil lipídico, mejorando la función endotelial, induciendo efectos hipotensores, disminuyendo la inflamación y mejorando biomarcadores relacionados con la diabetes o la obesidad. Además, se ha descrito que estos compuestos pueden ser potentes agentes antimicrobianos y anticancerígenos (Mateos y cols., 2020). A continuación, se recogen algunos de los múltiples ensayos desarrollados con uno o varios de los triterpenoides propios del AOO.

Los estudios *in vitro* realizados para investigar la actividad de los triterpenos pentacíclicos frente a la oxidación de LDL inducida por iones de cobre demostraron que el ácido oleanólico y el ácido ursólico pueden proteger a estas lipoproteínas de la oxidación, considerado como un paso clave en la formación de la placa de ateroma (Andrikopoulos y cols., 2002; 2003). Allouche y cols. (2010) también evaluaron el efecto cardioprotector del uvaol, eritrodiol, ácido oleanólico y ácido maslínico mediante la medición de sus actividades tanto antioxidantes como antitrombóticas relacionadas con las partículas LDL-C, demostrando que el ácido maslínico es un potente antioxidante y que tanto el ácido ursólico como el eritrodiol exhiben actividades antioxidantes y antitrombóticas.

Por otra parte, la actividad antiinflamatoria de los ácidos y dialcoholes triterpénicos propios del AOO también ha sido evaluada en diversos ensayos *in vitro* e *in vivo*. Así, los estudios llevados a cabo con el ácido maslínico han evidenciado la potente acción antiinflamatoria de este compuesto, inhibiendo mecanismos proinflamatorios como la vía de transducción de señales del factor nuclear kappa B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B, NF- $\kappa$ B) en astrocitos corticales estimulados con lipopolisacáridos (Huang y cols., 2011), o suprimiendo la producción de TNF- $\alpha$  y la expresión de genes asociados a la respuesta inflamatoria [óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o ciclooxigenasa-2 (COX-2)] en células RAW 264.7 (Fukumitsu y cols., 2016). Otro componente que ha demostrado ejercer efectos beneficiosos en la inflamación alérgica es el uvaol, inhibiendo la afluencia de eosinófilos y la producción de IL-5 en modelos murinos alérgicos inducidos por ovoalbúmina (Agra y cols., 2016).

Por último, en una extensa revisión realizada por Kashyap y cols. (2016) para conocer las prometedoras actividades antiinflamatorias del ácido oleanólico y el ácido ursólico, los autores concluyeron que los principales efectos antiinflamatorios de estas moléculas están mediados por la inactivación de las vías NF- $\kappa$ B, el factor transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) 3/6 y la vía de señalización de fosfoinositol 3-cinasa/AKT/diana de rapamicina en células de mamífero (PI3K/AKT/mTOR).

El efecto de los ácidos y dialcoholes triterpénicos sobre la modulación de los biomarcadores del perfil lipídico también ha sido investigado en numerosos ensayos previos. De este modo, un estudio desarrollado en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol observó un efecto hipolipidémico (reducción de los triglicéridos séricos, CT, LDL-C) tras la administración oral de ácido oleanólico y ácido maslínico (100 mg/kg) durante dos semanas, concluyendo que los triterpenos poseen efectos terapéuticos inhibiendo la absorción intestinal y el almacenamiento de colesterol (Liu y cols., 2007). Asimismo, en ratas inducidas a infarto de miocardio por tratamiento con isoproterenol, la administración oral de 15 mg/kg de ácido maslínico durante una semana causó una mejora del perfil lipídico, reduciendo las concentraciones de CT, TG, LDL-C y VLDL-C, y aumentando el HDL-C (Hussain Shaik y cols., 2012). Durante el mismo ensayo también se observó una mejora en la actividad de las enzimas marcadoras cardíacas (creatina quinasa, alanina transaminasa, aspartato transaminasa y  $\gamma$ -glutamil transferasa), una reducción de los niveles séricos de malondialdehído (MDA, marcador de peroxidación lipídica) y un aumento de la actividad de la paraoxonasa (PON, enzima integrante de la partícula HDL-C) (Hussain Shaik y cols., 2012). El ácido oleanólico y su isómero el ácido ursólico también han demostrado ejercer una acción antihiperlipidémica (disminución de LDL-C y TG), hipoglucemiante (disminución de la glucosa en sangre) y antioxidante (aumento de la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) tras la administración diaria de 60 mg/kg de ácido oleanólico y ácido ursólico durante 6 semanas en ratas hipertensas Dahl (sensibles a la sal). Este mismo tratamiento también previno el desarrollo de hipertensión arterial grave debido a la potente actividad diurética, natriurética y salurética de estos dos ácidos triterpénicos (Somova y cols., 2003). En este sentido, el ácido oleanólico ha sido asociado con efectos beneficiosos sobre la modulación de la presión arterial en dos ensayos desarrollados en ratas tras su administración a dosis bajas (30 mg/kg) (Liu y cols., 2012) y altas (60 mg/kg) (Bachhav y cols., 2011).

Dada la asociación bien establecida entre la función endotelial, la aterogénesis y el riesgo cardiovascular, el posible papel vasoprotector de los triterpenos pentacíclicos propios del AOO ha sido un importante objetivo terapéutico. Así, se ha evidenciado que los ácidos y dialcoholes triterpénicos del AOO, en particular el ácido oleanólico y el ácido maslínico, ejercen una notable acción directa sobre las células endoteliales y del músculo liso vascular, al promover la liberación de moléculas vasoprotectoras, como el óxido nítrico, y/o disminuir la participación de sustancias deletéreas (como el anión superóxido) (Rodríguez-Rodríguez, 2015; Luna-Vázquez y cols., 2016).

En lo que respecta a la diabetes, una reciente revisión bibliográfica analizó los diversos ensayos clínicos y experimentales desarrollados en animales para evaluar el efecto del ácido oleanólico sobre la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, informando que este compuesto mejora el área bajo la curva de la glucosa y la insulina (en las pruebas de tolerancia a la glucosa), reduce el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) y disminuye los niveles séricos de glucosa e insulina en ayunas (Fernández-Aparicio y cols., 2019). Asimismo, otra revisión desarrollada por Qian y cols. (2021), que evaluó los efectos farmacológicos del ácido oleanólico, ácido maslínico y ácido ursólico, concluyó que estos compuestos ejercen un efecto antidiabético al inhibir la  $\alpha$ -glucosidasa (enzima esencial para el catabolismo del glucógeno) y aumentar la captación celular de glucosa. Otros autores también han evidenciado que el ácido oleanólico y el ácido maslínico evitan el aumento de los niveles postprandiales de glucosa plasmática en ratas diabéticas, disminuyendo la expresión del transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT-1) y del transportador de glucosa-2 (GLUT-2) en el intestino delgado, además de inhibir la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y sacarasa, enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa (Khathi y cols., 2013). Asimismo, la actividad preventiva de los triterpenos sobre la DM2 ha sido estudiada en un reciente ensayo de intervención llevado a cabo en 176 pacientes prediabéticos, donde se observó que el consumo de 55 mL/día de aceite de oliva enriquecido con ácido oleanólico (dosis equivalente 30 mg ácido oleanólico/día) reducía el riesgo de desarrollar diabetes en este grupo de población (Santos-Lozano y cols., 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que los ácidos triterpénicos presentan una notable actividad antimicrobiana, actuando contra importantes patógenos humanos como las micobacterias, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o diferentes especies de

protozoos (Jesús y cols., 2015; Mateos y cols., 2020). Por último, se ha confirmado que los triterpenoides pentacíclicos obtenidos a partir de materiales vegetales naturales pueden tener un papel beneficioso frente al cáncer, pues se ha reportado su capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales e inducir la apoptosis, aumentando la vida de los ratones portadores de tumores en comparación con los animales control y previniendo la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales a distintos órganos en diversos modelos preclínicos de cáncer (Zhang y cols., 2014; Khwaza y cols., 2020).

#### 4.2.2. Escualeno

##### 4.2.2.1. Definición y estructura química

El escualeno es una biomolécula lipofílica que pertenece a la clase de los triterpenos. Es un compuesto isoprenoide de 30 carbonos con seis dobles enlaces cuya fórmula molecular es  $C_{30}H_{50}$  (Figura 12). En la biosíntesis del escualeno, la enzima escualeno sintasa cataliza una reacción de unión de dos unidades de farnesil difosfato para formar una molécula de escualeno. Este compuesto es un intermediario metabólico en la biosíntesis de esteroides, como el colesterol en células animales y los fitoesteroides en células vegetales (Kim y Karadeniz, 2012; Martínez-Beamonte y cols., 2020; Micera y cols., 2020).

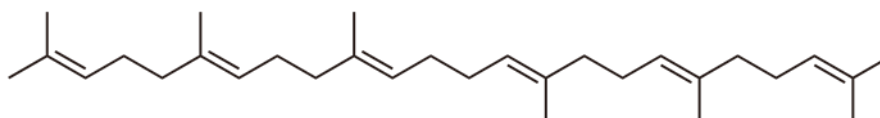


Figura 12. Estructura química del escualeno.

##### 4.2.2.2. Fuente e ingesta

En el cuerpo humano, el escualeno está presente en múltiples órganos y tejidos, siendo el hígado el órgano primordial responsable de su biosíntesis y la principal vía por la que este compuesto entra en la circulación sistémica (Micera y cols., 2020).

El escualeno fue aislado por primera vez en el aceite de hígado de tiburón en 1903 por el Dr. Tsujimoto, constituyendo hoy en día la principal fuente de este compuesto orgánico (Tsujimoto, 1916; Kim y Karadeniz, 2012; Martínez-Beamonte y cols., 2020). Sin embargo, dada la amenaza que esto supone para la especie, otras fuentes naturales se utilizan como alternativa para la obtención de este compuesto (Micera y cols., 2020). Las fuentes vegetales de escualeno más destacadas se hallan en la fracción insaponificable de los aceites vegetales como el amaranto, el arroz, el germen de trigo, la semilla de uva, el cacahuete, la soja y la aceituna, siendo esta última la más relevante por detrás del aceite de hígado de tiburón (Micera y cols., 2020). El contenido medio de escualeno en este aceite vegetal varía de entre 900-10000 mg/kg en el AOV y AOVE, a 500-6000 mg/kg en el AOR y AOO (Mateos y col., 2020). Este amplio abanico en la concentración de escualeno entre las distintas categorías de aceite de oliva está influenciado por la maduración del fruto, el tipo del suelo, el riego o el proceso de extracción aplicado, entre otros (Martínez-Beamonte y cols., 2020; Micera y cols., 2020).

La ingesta media de escualeno varía según los hábitos dietéticos de la zona geográfica que se esté valorando. Así, en países de la cuenca mediterránea donde el consumo de aceite de oliva está afianzado a su cultura gastronómica, la ingesta de escualeno puede alcanzar los 200-400 mg/día, muy por encima de países como Estados Unidos cuyo consumo medio ronda los 30 mg/día (Smith, 2000).

#### 4.2.2.3. Efectos en salud

El escualeno es un triterpeno ampliamente distribuido en la naturaleza que desempeña un papel importante como intermediario metabólico en la biosíntesis de esteroides (Micera y cols., 2020). Hasta la fecha, un gran número de ensayos han evidenciado que el escualeno posee actividades antioxidantes, cardioprotectoras y anticancerígenas. Además, gracias a su composición química, este compuesto es empleado como desintoxicante, emoliente y vehículo para la administración de fármacos y vacunas, entre otros (Kim y Karadeniz, 2012; Cárdeno y cols., 2015).

El potente efecto antioxidante del escualeno ha sido investigado en tejido epitelial, expuesto a factores ambientales que conducen a estrés oxidativo. En este sentido, el escualeno ha demostrado ejercer un efecto protector en la piel frente al daño oxidativo

causado por la radiación inducida por los rayos ultravioletas (Lozano-Grande y cols., 2018), así como una actividad protectora en la formación de aniones superóxido en los queratinocitos (células predominantes de la epidermis) (Popa y cols., 2015).

Además, este compuesto ha sido evaluado por su implicación en el desarrollo de estados fisiopatológicos asociados a estrés oxidativo, como la hipercolesterolemia, la hipertensión o la hiperglucemia (Ibrahim y cols., 2020; Micera y cols., 2020). Se sabe que el escualeno ejerce un efecto cardioprotector, similar a las estatinas, a través de la inhibición de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima clave en la biosíntesis de colesterol (Strandberg y cols., 1989). Teniendo en cuenta que las estatinas son el tratamiento por excelencia para reducir el colesterol circulante y el LDL-C, este compuesto ha sido evaluado en numerosos ensayos clínicos llevados a cabo en sujetos hipercolesterolémicos. Según recoge la extensa revisión bibliográfica realizada por Ibrahim y cols. (2020), de los tres ensayos evaluados en esta población con niveles elevados de colesterol, sólo el controlado aleatorizado realizado por Chan y cols. (1996) demostró que la suplementación con 860 mg/día de escualeno durante 20 semanas disminuía significativamente los niveles de CT y LDL-C en comparación con el grupo placebo. Además, en este mismo estudio la suplementación con escualeno también redujo los niveles de TG en un 5,3% y aumentó en un 1,8% los niveles de HDL-C (Chan y cols., 1996). En cambio, la administración durante 30 días de 900 mg/día de escualeno (Strandberg y cols., 1990), así como la ingesta a largo plazo (nueve semanas) de 0,5 g/día y 1 g/día (Miettinen y Vanhanen, 1994), mostraron resultados nulos o inconsistentes, respectivamente. Por tanto, se requieren más ensayos de intervención con escualeno para esclarecer los controvertidos resultados obtenidos en los estudios citados anteriormente. Se sabe que la dislipemia puede conducir a la aparición de arterosclerosis, considerada como la principal causa de enfermedad cardiovascular. A este respecto, un estudio *in vitro* realizado por Granados-Principal y cols. (2012) determinó que el escualeno puede ejercer un efecto preventivo frente a esta patología al inhibir la captación de LDLox por parte de los macrófagos mediante la reducción de la expresión de CD36.

En relación a la hipertensión, los ensayos llevados a cabo con el escualeno han mostrado efectos positivos en la reducción de la presión arterial. Así, Martirosyan y cols. (2007) mostraron que el aceite de amaranto (obtenido a partir de semillas de hierbas del género *Amaranthus*), rico en escualeno, reducía la presión arterial sistólica con

independencia de la dosis de aceite ingerido. Asimismo, un estudio llevado a cabo en ratas también mostró un efecto hipotensor tras la administración de una dieta rica en escualeno durante 4 semanas (Liu y cols., 2009).

Por último, en los últimos años algunos autores han propuesto el uso de escualeno como antioxidante para disminuir la glucosa plasmática (Micera y cols., 2020). A este respecto, mientras Liu y cols. (2009) observaron una reducción de la glucosa plasmática en ratas alimentadas con una dieta alta en escualeno (a una dosis de 1 g/kg), Valdés y cols. (2019) no observaron actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos (inducidos por estreptozotocina) tras la administración de 50 mg/kg, señalando la necesidad de un mayor número de investigaciones que permitan definir el papel del escualeno en la homeostasis glucídica.

#### 4.2.3. Alcoholes grasos alifáticos

##### 4.2.3.1. Definición y estructura química

Los alcoholes grasos alifáticos (o alcoholes de cadena larga) son alcoholes primarios de cadena lineal y alto peso molecular, que pueden variar según la procedencia desde los 4-6 átomos de carbonos hasta los 22-28. En el presente trabajo se detallan los principales alcoholes grasos alifáticos identificados en el AOO, tetracosanol (C<sub>24</sub>), hexacosanol (C<sub>26</sub>), octacosanol (C<sub>28</sub>) y docosanol (C<sub>22</sub>) (Figura 13). Todos estos alcoholes grasos están formados por un único grupo hidroxilo unido al carbono terminal, diferenciándose en el número de átomos de carbono. El tetracosanol (C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>O) está formado por 24 átomos de carbono, presenta un peso molecular de 354,7 g/mol y, por lo general, deriva del ácido lignocérico. El hexacosanol (C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>O) es un alcohol graso constituido por 26 átomos de carbono, con un peso molecular de 382,7 g/mol, que deriva del ácido cerótico. Otro componente, el octacosanol (C<sub>28</sub>H<sub>58</sub>O), presenta un peso molecular superior al resto de 410,8 g/mol, está formado por 28 átomos de carbono y deriva del ácido caprílico. Por último, el docosanol (C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>O) deriva del ácido behénico, está constituido por 22 átomos de carbono y tiene un peso molecular de 326,6 g/mol (Noweck y Grafahrend, 2006) (Figura 13).

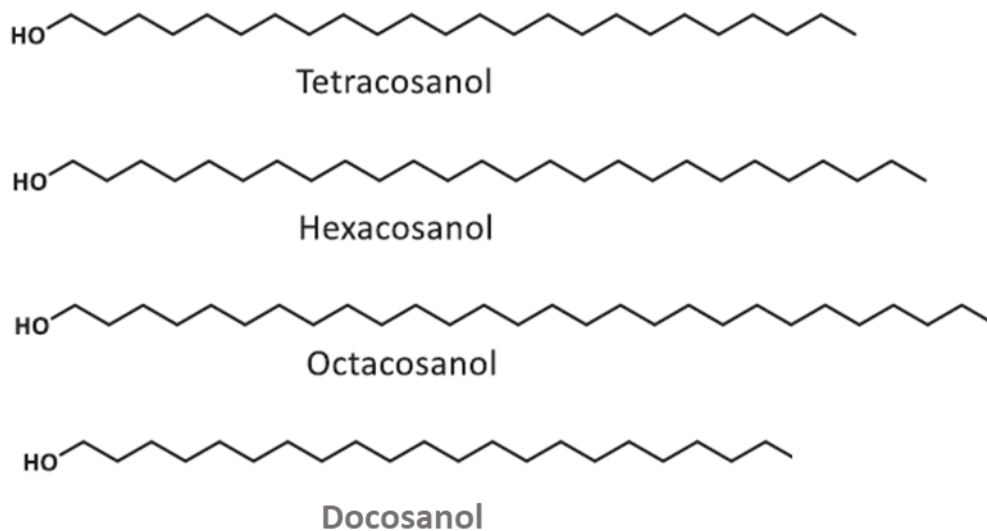


Figura 13. Estructura química del tetracosanol, hexacosanol, octacosanol y docosanol.

#### 4.2.3.2. Fuente e ingesta

Los alcoholes grasos alifáticos se encuentran ampliamente en las ceras de diversas plantas y animales. También se han identificado en numerosos alimentos como el arroz, el trigo, la caña de azúcar, la espinaca o la cera de abejas (Koch y Barthlott, 2006; Fernández-Arche y cols., 2009). Además, en el AOO constituyen un grupo importante de compuestos, presentes en concentraciones que varían entre 1000 y 3000 mg/kg (Fernández-Arche y cols., 2009), siendo su concentración sustancialmente mayor si se compara con otras categorías de aceite de oliva como el AOV/AOVE (<350 mg/kg) o AOR (<350 mg/kg) (Mateos y cols., 2020).

Por el momento no se han reportado datos que informen del consumo medio de alcoholes grasos alifáticos en la población adulta. Asimismo, se desconoce la ingesta diaria recomendada o los objetivos nutricionales a alcanzar con estos compuestos.

#### 4.2.3.3. Efectos en salud

El consumo de alcoholes grasos alifáticos se ha asociado con efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico, la presión arterial y la función endotelial (Singh y cols., 2006; Fernández-Arche y cols., 2009; Askarpour y cols., 2019). En su gran mayoría, los ensayos que han reportado estas propiedades en salud han sido desarrollados con policosanol, considerado como una mezcla comercial de alcoholes grasos de cadena larga derivados de la caña de azúcar purificada, cuyos componentes principales son el octacosanol (C28), el triacontanol (C30) y el hexacosanol (C26) (Askarpour y cols., 2019). Distintos estudios de intervención en humanos han indicado que la ingesta de 5-20 mg/día de policosanol puede ejercer efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico (Varady y cols., 2003). Otra revisión sobre la importancia nutricional y el metabolismo de alcoholes grasos de cadena muy larga procedentes de ceras dietéticas mostró su potencial efecto hipolipidémico. Así, distintos estudios clínicos que analizaron los efectos de la ingesta de 5 a 20 mg/día de alcoholes mixtos C24-C34, incluyendo el octacosanol (C28) y el triacontanol (C30), mostraron una reducción de los niveles de LDL-C y un aumento de los niveles de HDL-C (Hargrove y cols., 2004).

No obstante, aunque el AOO tiene una alta concentración de alcoholes grasos alifáticos, su actividad biológica sólo ha sido investigada en un ensayo *in vitro* desarrollado por Fernández-Arche y cols. (2009), donde se evaluó su actividad antiinflamatoria. En este estudio se demostró que los principales alcoholes grasos alifáticos identificados en el AOO (tetracosanol, hexacosanol, octacosanol) podían reducir la producción por células inmunitarias de diferentes mediadores inflamatorios (eicosanoides, citoquinas y óxido nítrico) al interferir en diferentes etapas de sus vías metabólicas, como la inhibición de la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) y la expresión de iNOS (Fernández-Arche y cols., 2009), manifestando el papel protector de este aceite contra daños inflamatorios.

#### 4.2.4. Fitoesteroles y tocoferoles

Los fitosteroles y los tocoferoles constituyen dos tipos de compuestos de gran importancia en el AOO, siendo el  $\beta$ -sitosterol y el  $\alpha$ -tocoferol los más abundantes en esta categoría de aceite vegetal.

#### 4.2.4.1. Definición y estructura química

Los esteroides derivan de la biosíntesis del escualeno y están compuestos por cuatro anillos condensados: tres anillos de ciclohexano (de 6 átomos de carbono) y uno de ciclopentano (de 5 átomos de carbono), un grupo hidroxilo en el carbono 3 y una cadena lateral con un doble enlace y/o un grupo metilo o etilo (Lombardo y cols., 2018). En el caso del  $\beta$ -sitosterol ( $C_{29}H_{50}O$ ), tiene un peso molecular de 414,7 g/mol y está constituido por 10 átomos de carbono en su cadena lateral y un doble enlace en el carbono 5 (Bin Sayeed y cols., 2016) (Figura 14).

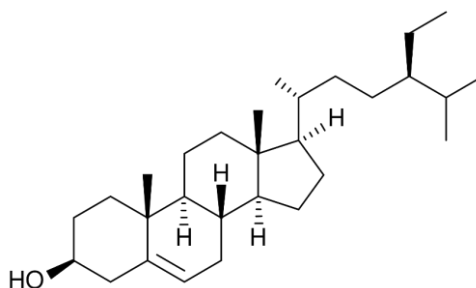


Figura 14. Estructura química de  $\beta$ -sitosterol.

Los tocoferoles o vitamina E, es el nombre colectivo de los compuestos lipofílicos de origen natural cuya estructura molecular se compone de un anillo de cromanol y una cadena lateral ubicada en el carbono 2. Los tocoferoles hacen referencia a un grupo de ocho compuestos diferentes,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferoles, y los cuatro tocotrienoles correspondientes (Péter y cols., 2015). Los tocoferoles están compuestos por una cadena lateral de hidrocarburos saturada que varía según el número y la posición del grupo metilo. En el caso de los tocotrienoles, presentan una cadena lateral de isoprenilo insaturada que contiene tres dobles enlaces en los carbonos 3, 7 y 11. La isoforma  $\alpha$ -tocoferol ( $C_{29}H_{50}O_2$ ) presenta tres grupos metilos en las posiciones C5, C7 y C8, con un peso molecular de 430,7 g/mol (Zingg, 2015) (Figura 15).

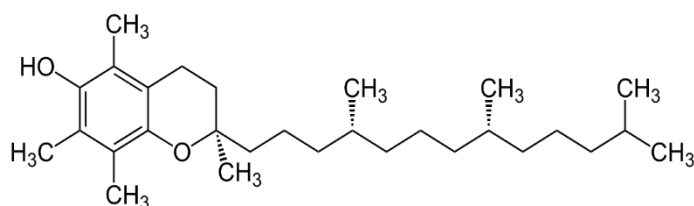


Figura 15. Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol.

#### 4.2.4.2. Fuente e ingesta

Los fitoesteroles se encuentran en estado natural en diversas plantas y productos derivados, y en particular en los aceites (Bin Sayeed y cols., 2016). Así, el contenido medio de estos compuestos en los AOV y AOVE se sitúan en torno a los 800-2400 mg/kg, por debajo de los 1800-3000 mg/kg cuantificados en los AOO (Mateos y cols., 2020). La ingesta recomendada de este micronutriente ha sido establecida por varias guías dietéticas en 2 g/día con el propósito de reducir los niveles de LDL-C. Sin embargo, considerando que la ingesta media en los países occidentales es de unos 300 mg/día, se suele recurrir a productos fortificados para alcanzar esta recomendación (Cabral y Klein, 2017).

La vitamina E, en particular el  $\alpha$ -tocoferol, está presente en varios alimentos básicos, como los aceites vegetales, el aceite de palma, el salvado de arroz, el germen de trigo, las aceitunas, la cebada, la soja, los frutos secos y los cereales (Mohd Zaffarin y cols., 2020). En los aceites de oliva su contenido varía entre los 110-300 mg/kg (Mateos y cols., 2020). En el caso del AOO, aunque durante el proceso de refinado se pierde parte del contenido de  $\alpha$ -tocoferol, contiene unos 200 mg/kg que aumentan tras el proceso de “encabezado” (adición de AOV/AOVE antes de la comercialización del AOO). Además, y con la finalidad de reponer el tocoferol natural perdido durante el proceso de refinado, está permitido añadir hasta 200 mg/kg de este compuesto (Reglamento (UE) n° 1129/2011). La ingesta recomendada de vitamina E para la población adulta española está establecida en 12 mg/día (Moreiras y cols., 2016). En el caso de Europa, la EFSA estableció la ingesta adecuada de vitamina E en 13 y 11 mg/día para hombres y mujeres, respectivamente (EFSA, 2015). Sin embargo, la gran mayoría de las valoraciones dietética reportadas indican que el consumo de esta vitamina liposoluble se encuentra por debajo de la ingesta diaria recomendada (Péter y cols., 2015).

#### 4.2.4.3. Efectos en salud

Durante décadas los fitoesteroles han sido propuestos como ingredientes funcionales por su capacidad para reducir el colesterol en sangre. Así, numerosos estudios han demostrado que la suplementación dietética con fitoesteroles reduce los niveles de colesterol, bien por la inhibición de la absorción de colesterol (Quilez y cols., 2003), bien por la disminución de la producción de Apo B, tanto en el hígado como en el intestino (Ho y Pal, 2005). En consecuencia, la EFSA admitió que una ingesta diaria de 1,5-3 g de esteroides/estanoles puede reducir LDL-C en un 11% y, por tanto, reducir el riesgo de enfermedad coronaria (EFSA, 2012). Del mismo modo, y con el propósito de conocer el comportamiento de los fitoesteroles sobre otras comorbilidades de la enfermedad coronaria, otros ensayos han evaluado el papel de los fitoesteroles sobre la arterosclerosis. Sin embargo, varios estudios en humanos no observaron ninguna relación entre la ingesta de fitoesteroles y una menor incidencia de aterosclerosis o, incluso, dicha asociación ha sido negativa, señalando la necesidad de realizar nuevos estudios a largo plazo en humanos para determinar el papel de los fitoesteroles sobre esta patología (Hansel y cols., 2011).

Los efectos de los fitoesteroles sobre la función endotelial o la inflamación también han sido evaluados en diversos estudios previos. Así, un estudio cruzado, doble ciego conducido en 42 niños con antecedentes familiares de hipercolesterolemia no observó cambios sobre la dilatación mediada por flujo (marcador de función endotelial) tras la administración diaria de 2,3 g de una mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol y otros). Sin embargo, en dicho ensayo se observó un efecto reductor de los niveles de CT y LDL-C en comparación al grupo placebo (de Jongh y cols., 2003).

La actividad antiinflamatoria de los esteroides ha sido recogida en numerosos ensayos desarrollados con el fitoesterol más común de la dieta, el  $\beta$ -sitosterol. Según se recoge en la revisión bibliográfica realizada por Bin Sayeed y cols. (2016), este compuesto ha demostrado poseer actividad antiinflamatoria en diversos ensayos en animales al reducir la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y edemas, o aumentar la actividad antiinflamatoria, inactivando el NF- $\kappa$ B o STAT1 (Valerio y Awad, 2011; Bin Sayeed y cols., 2016). Además, el  $\beta$ -sitosterol también ha demostrado poseer actividades antioxidantes, antimicrobianas, antiangiogénicas, inmunomoduladoras, antidiabéticas y

anticancerígenas (Bin Sayeed y cols., 2016). Sin embargo, muchos de los resultados observados en los estudios *in vitro* no son extrapolables o reproducidos *in vivo*; por lo tanto, se necesitan estudios a largo plazo controlados con placebo en humanos para aclarar la bioactividad de este fitoesterol (Derdemezis y cols., 2010).

La vitamina E es bien conocida por su potente actividad antioxidante, capaz de eliminar ROS y radicales libres. La presencia de un grupo hidroxilo en el anillo de cromanol permite donar fácilmente un átomo de hidrógeno para reducir radicales libres (Miyazawa y cols., 2019). Además de su conocida función antioxidante, la vitamina E también ha demostrado tener efectos antiinflamatorios al inhibir moléculas mediadoras de la inflamación como los eicosanoides y la enzima COX-2 (Mohd Zaffarin y cols., 2020). Asimismo, esta vitamina ha demostrado suprimir las vías de señalización proinflamatorias, como NF- $\kappa$ B o las vías mediadas por STAT-3 (Zingg, 2015). Tales propiedades han suscitado un gran interés entre los investigadores por conocer el potencial terapéutico de esta vitamina en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. De este modo, se han desarrollado varios estudios para demostrar los posibles efectos beneficiosos de la vitamina E en neuroprotección, en salud cardiovascular, efectos sobre la piel o como tratamiento contra el cáncer (Mohd Zaffarin y cols., 2020). En lo que respecta a los trastornos cardíacos, una reciente revisión bibliográfica que recogió los distintos ensayos clínicos llevados a cabo con la vitamina E y su papel preventivo en dicha patología determinó que no todos los estudios han informado de resultados beneficiosos tras la suplementación con esta vitamina (Sozen y cols., 2019). Estos autores concluían que era necesario abordar el posible establecimiento de criterios de selección, así como la presencia de biomarcadores específicos, para anticipar quién podría beneficiarse de la suplementación con esta vitamina (Sozen y cols., 2019). Con respecto a su actividad neuroprotectora, un ensayo controlado, aleatorio y doble ciego realizado en 100 sujetos con daño neurológico por impacto severo en la cabeza mostró que la inyección intramuscular con vitamina E (400 UI/día) tras el trauma resultó en una tasa de mortalidad significativamente menor en comparación con los grupos tratados con vitamina C y placebo (Razmkon y cols., 2011).

En cuanto a su posible aplicación en tratamientos contra el cáncer, la vitamina E posee prometedoras propiedades anticancerígenas, como la supresión de la proliferación de células cancerosas, la prevención de la angiogénesis, la modulación de diversos

factores de crecimiento, la promoción de la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. Sin embargo, la gran mayoría de estos hallazgos se dieron cuando los ensayos fueron desarrollados con otras isoformas distintas al  $\alpha$ -tocoferol, en concreto con los tocotrienoles (Abraham y cols., 2019).

Por último, en el campo de la dermatología esta vitamina es ampliamente utilizada por sus efectos antioxidantes y protectores frente a la radiación ultravioleta, aportando fotoprotección y retrasando el envejecimiento cutáneo (Mohd Zaffarin y cols., 2020).

## 5. Potencial en salud del aceite de orujo de oliva

El primer ensayo desarrollado con el AOO se remonta al año 2005, cuando Sánchez-Perona y cols. (2005) evaluaron los efectos antioxidantes de diferentes fuentes grasas monoinsaturadas (aceite de girasol alto oleico (AGAO), AOR y AOO) sobre la peroxidación lipídica en microsomas viscerales de ratón, mostrando que el consumo de AOO protegía al hígado de la oxidación de forma más potente por su mayor contenido en triterpenos (eritrodiol y ácido oleanólico). Este efecto antioxidante también se observó en otro estudio realizado en ratas tras la administración de una dieta suplementada con AOO o AOR durante 8 semanas, con una reducción en la producción de peróxido de hidrógeno en macrófagos peritoneales (de la Puerta y cols., 2009).

Debido a los innumerables estudios que relacionaban el contenido en ácido oleico y compuestos minoritarios del aceite de oliva con efectos saludables sobre los factores de riesgo cardiovascular, otras líneas de investigación centraron su atención en conocer el comportamiento de los componentes propios del AOO en factores vinculados con ECV, como la hipertensión o la disfunción endotelial. En este sentido, Rodríguez-Rodríguez y cols. (2007) observaron que la ingesta durante tres meses de una dieta enriquecida con AOO (con un contenido de ácido oleanólico de 200 ppm) y AOO rico en ácido oleanólico (800 ppm) mejoraba la función de las arterias, con una mayor expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en ratas espontáneamente hipertensas, especialmente en aquellas alimentadas con el AOO enriquecido. Más adelante, el mismo grupo de investigación señaló que una dieta enriquecida con AOO ejercía un efecto beneficioso sobre las arterias mesentéricas de ratas hipertensas, con una mayor respuesta del EDHF, considerado como un componente vasoactivo que promueve la vasodilatación (Rodríguez-Rodríguez y cols., 2009). A pesar de que la restauración de la presión arterial fue uno de los objetivos a alcanzar en los anteriores estudios (Rodríguez-Rodríguez y cols., 2007; 2009), no se observaron cambios significativos en este parámetro. Por el contrario, el estudio llevado a cabo por Valero-Muñoz y cols. (2014) observó que ratas hipertensas tratadas con AOO enriquecido con ácidos triterpénicos (56,8 mg/kg/día de ácido oleanólico y 38,0 mg/kg/día de ácido maslínico) mitigaba la presión arterial. Este efecto estuvo acompañado por una mayor expresión de eNOS y una menor expresión de mediadores inflamatorios (TNF- $\alpha$ ) y fibróticos [factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) y colágeno tipo I] en la aorta. Tras estos prometedores resultados sobre la función

vascular, el comportamiento del AOO enriquecido en ácidos triterpénicos fue evaluado en otro ensayo llevado a cabo en ratas obesas (inducidas por la dieta), con el objetivo de conocer el comportamiento de este aceite vegetal sobre las complicaciones metabólicas de la obesidad. Así, el consumo durante 10 semanas de una dieta rica en AOO enriquecido en ácido oleanólico y ácido maslínico mostró una reducción sustancial del peso corporal, la resistencia a la insulina, la inflamación del tejido adiposo (TNF- $\alpha$  y MCP-1) y, en particular, una mejora de la función vascular (vasodilatación dependiente del endotelio, entre otros) (Claro-Cala y cols., 2020).

Por otro lado, la respuesta postprandial del consumo agudo de AOO en el comportamiento y metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) también ha sido evaluado por su relación con la arterosclerosis. A este respecto, se demostró que la fracción insaponificable del AOO (en comparación con el AOR) inducía la liberación de partículas TRL con mayores niveles de TG que se hidrolizaban más rápidamente a sus correspondientes partículas remanentes (Cabello-Moruno y cols., 2007; 2014), lo que posteriormente se asoció a una preferencia de la LPL por estas especies moleculares (Cabello-Moruno y cols., 2014). Además, se siguió investigando la actividad de los componentes menores del AOO sobre la expresión del receptor VLDL (VLDLr) en macrófagos tratados con TRL obtenidas tras la ingesta de 70 g de AOO en comparación con el AOR. En este caso se observó de nuevo cómo los componentes menores del AOO influían en la composición de las TRL, aumentando la expresión de VLDLr en los macrófagos (Cabello-Moruno y cols., 2015).

El efecto postprandial del AOO también ha sido comparado con el AOV y con el AOO enriquecido con ácido oleanólico (575 mg/kg) para conocer el efecto de las TRL aisladas tras el consumo de estos aceites en distintos marcadores inflamatorios. De este modo, se comprobó que todos los aceites estudiados, y en particular el enriquecido en ácido oleanólico, provocaban cambios en la composición de las TRL, así como la reducción de MCP-1, de la secreción de citoquinas (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y de la expresión de COX-2 en macrófagos, indicando un posible efecto antiinflamatorio del ácido oleanólico (Graham y cols., 2012).

Todos estos ensayos *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, así como los escasos estudios en humanos con aceite de oliva enriquecido con alguno de los componentes minoritarios del AOO demuestran que el AOO es una importante fuente dietética que

podría contribuir positivamente al mantenimiento de la salud cardiovascular y patologías asociadas. Sin embargo, la falta de ensayos clínicos con el aceite en sí no permite conocer si lo observado en estos ensayos se reproduce en humanos.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES**



El AO constituye la principal fuente de grasa de la dieta mediterránea. Se obtiene exclusivamente del fruto del olivo del que, dependiendo del proceso tecnológico al que se somete, se obtienen las distintas categorías comerciales: AOVE, AOV, AO (suave e intenso) y AOO. Numerosos antecedentes bibliográficos apoyan el papel beneficioso del AOVE sobre la salud, mejorando varios marcadores de riesgo cardiovascular debido a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados, especialmente ácido oleico, así como de micronutrientes y moléculas bioactivas. Sin embargo, otras categorías de AO, como el AOO, han sido menos exploradas.

Se sabe que el AOO es una fuente grasa monoinsaturada, rica en ácido oleico, con un importante y variado contenido en compuestos bioactivos que pueden contribuir positivamente en el mantenimiento de la salud. Los principales componentes bioactivos identificados en este aceite con implicación en salud son los ácidos y dialcoholes triterpénicos, escualeno, tocoferoles, esteroides y alcoholes grasos alifáticos.

Los alcoholes y ácidos triterpénicos representan dos de los compuestos más específicos del AOO. Ambos compuestos se encuentran en cantidades importantes en el AOO (~500 mg/kg) en comparación con el AOV/AOVE (<250 mg/kg) y el AOR (<250 mg/kg), estando ausente en los aceites de semilla. Estos compuestos pueden jugar un papel clave en la prevención de ECV y sus factores de riesgo, modulando el perfil lipídico, mejorando la función endotelial, con efectos hipotensores, antiinflamatorios y mejorando los biomarcadores relacionados con la prevención de diabetes y obesidad. Además de su efecto frente a enfermedades crónicas, estos compuestos se han descrito como potentes agentes antimicrobianos y anticancerígenos.

Otros componentes característicos del AOO son los alcoholes grasos alifáticos, con contenidos muy superiores (1000-3000 mg/kg) a los detectados en el AOV/AOVE (<350 mg/kg), el AOR (<350 mg/kg) o en aceites de semillas (<50 mg/kg). Estudios clínicos han demostrado que una mezcla de alcoholes grasos de cadena entre C24 y C34 disminuye los niveles de LDL-C y aumenta los niveles de HDL-C. Los tocoferoles, escualeno y fitoesteroides, también han demostrado tener una notable actividad biológica.

Por lo tanto, el AOO, además de su composición rica en ácido oleico, contiene una fracción minoritaria de compuestos que pueden posicionar a este aceite como una fuente saludable de grasa en nuestra dieta. Hasta el momento, numerosos estudios *in vitro* y

preclínicos han evaluado uno o varios componentes de la fracción minoritaria del AOO obteniendo resultados prometedores. Además, se han llevado a cabo algunos estudios para conocer la composición y propiedades de lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas de manera postprandial tras el consumo puntual de altas dosis de este aceite. Sin embargo, a diferencia de los AOV/AOVE, el efecto en salud derivado del consumo regular de AOO permanece por estudiar.

Teniendo en cuenta la composición tanto de la fracción lipídica como de la fracción minoritaria del AOO, cabe **hipotetizar** que el consumo sostenido de AOO en la dieta puede ejercer efectos beneficiosos en salud, principalmente frente a enfermedad cardiovascular y potencialmente frente a otras disfunciones metabólicas relacionadas con la homeostasis glucídica, el sobrepeso/obesidad, la inflamación o el estrés oxidativo.

Para contrastar esta hipótesis y conocer el efecto a largo plazo del consumo del AOO en salud cardiovascular es necesario llevar a cabo estudios de intervención en sujetos con riesgo moderado de padecer patologías cardiovasculares. Asimismo, es de interés conocer el efecto del consumo sostenido de AOO en la población general, sin patologías definidas. Por ello, el **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral fue estudiar el efecto del consumo de AOO como principal grasa en la dieta, tanto en consumidores sanos como en una población con riesgo cardiovascular moderado (sujetos hipercolesterolémicos). Asimismo, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

**1. Valorar el potencial efecto cardioprotector del consumo de AOO**, analizando la presión arterial (presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardíaca) y el perfil lipídico (HDL-C, LDL-C, VLDL-C, CT, TG, apolipoproteínas, etc.), así como biomarcadores estrechamente relacionados con la función endotelial (óxido nítrico, enzima óxido nítrico sintasa endotelial y diversas moléculas de adhesión) y los procesos inflamatorios (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  y otras citoquinas y quimioquinas).

**2. Conocer el efecto del consumo de AOO en patologías relacionadas con la enfermedad cardiovascular (diabetes y obesidad)**, analizando diferentes biomarcadores asociados con la homeostasis glucídica y la resistencia a la insulina (niveles plasmáticos de glucosa, insulina o glucagón, índices HOMA-IR, QUICKI) y la obesidad (composición corporal, niveles plasmáticos de hormonas y adipoquinas como leptina, grelina o adipsina).

**3. Determinar el posible papel beneficioso de la ingesta regular de AOO frente a estrés oxidativo**, analizando la capacidad antioxidante en plasma, así como los niveles de biomarcadores de daño oxidativo a lípidos (MDA) y lipoproteínas (LDLox).

Para cumplir con estos objetivos se propuso la realización de dos estudios de intervención nutricional en los dos grupos de población mencionados, sujetos sanos (grupo normocolesterolémico) y con riesgo cardiovascular moderado (grupo hipercolesterolémico). En un primer estudio se comparó el AOO con un aceite con una composición grasa preferentemente monoinsaturada similar a la del AOO, el aceite de girasol alto oleico. En el segundo estudio se comparó el efecto del AOO con una grasa poliinsaturada de gran consumo en España, el aceite de girasol. Teniendo en cuenta que ambos aceites de semilla tienen un contenido bajo en los mencionados compuestos minoritarios del AOO, el diseño de estos dos estudios permitiría evaluar el comportamiento tanto de los componentes propios del AOO como de la composición lipídica del mismo.

Cabe mencionar que estos son los primeros estudios de intervención nutricional realizados en humanos para valorar el efecto del consumo regular del aceite de orujo de oliva en la dieta.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Aceites

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado el efecto en salud del AOO en personas sanas y con riesgo cardiovascular moderado (hipercolesterolemia). Para ello, se han llevado a cabo dos intervenciones nutricionales donde el AOO ha sido empleado como aceite objeto de estudio, y el aceite de girasol alto oleico (AGAO; estudio 1) y aceite de girasol (AG; estudio 2), como aceites controles. Asimismo, el AG y el aceite de maíz (AM) han sido empleados en las etapas basales y de lavado en los estudios 1 y 2, respectivamente. En el apartado 3.1 se detalla el orden de consumo de los aceites mencionados, junto a otros aspectos relacionados con el diseño de los estudios. Para ambas intervenciones, los aceites fueron proporcionados y envasados en botellas transparentes de 1L por la empresa Acesur, S.A. Para asegurar que el ensayo fuera ciego, las botellas no fueron etiquetadas, diferenciándose únicamente por el color de los tapones (AOO: verde; AGAO: amarillo oscuro; AG: amarillo claro; AM: rojo).

## 2. Caracterización química de los aceites del estudio

Los aceites utilizados en ambos estudios de intervención fueron analizados por la Unidad de Análisis del Instituto de la Grasa, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) empleando los siguientes métodos normalizados:

- Método ISO 12228-2:2014 para la determinación de esteroides.
- Reglamento (CEE) N° 2568/91 Anexo V para la determinación de los alcoholes triterpénicos.
- Reglamento (CEE) N° 2568/91 Anexo XIX para la determinación de los alcoholes alifáticos.
- Reglamento (CEE) N° 2568/91 Anexo X para la determinación de la composición de ácidos grasos.
- ISO 9936:2016 para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles.

Los ácidos triterpénicos se analizaron siguiendo el método de Pérez-Camino y Cert (1999), y el escualeno se determinó por cromatografía de gases (Giacometti, 2001). Los

fenoles se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución con detección de matriz de diodos en línea (HPLC-DAD) según el procedimiento desarrollado por Mateos y cols. (2001).

### 3. Ensayos clínicos

#### 3.1. Diseño de los estudios

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo dos estudios clínicos aleatorizados, cruzados, ciegos y controlados. Cada uno de los estudios tuvo una duración de 14 semanas, con dos etapas de intervención de cuatro semanas cada una, precedidas en cada caso de una etapa basal o de lavado de 3 semanas de duración. Durante el desarrollo del primer estudio se empleó el AOO y AGAO en las etapas de intervención y AG en la etapa basal y de lavado (Figura 16).

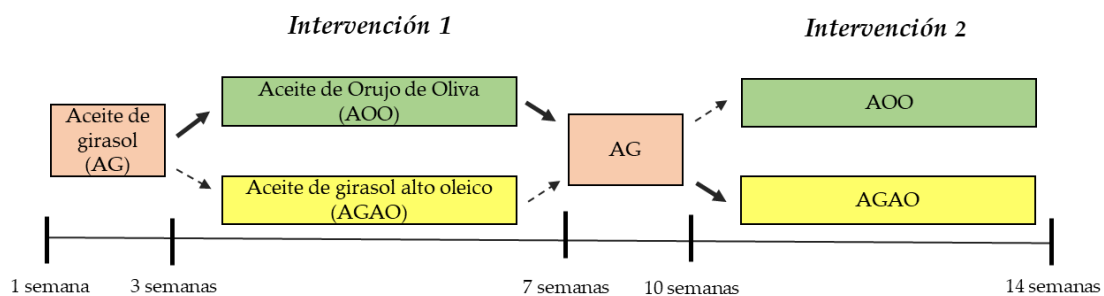


Figura 16. Diseño del primer estudio de intervención con aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol alto oleico (AGAO). Se utilizó aceite de girasol (AG) durante la etapa de basal y de lavado. Las líneas verticales indican las visitas/controles programados en el ensayo.

En el segundo ensayo, los aceites empleados en las dos etapas de intervención fueron el AOO y el AG. Para la etapa basal y de lavado los voluntarios consumieron aceite de maíz (Figura 17).

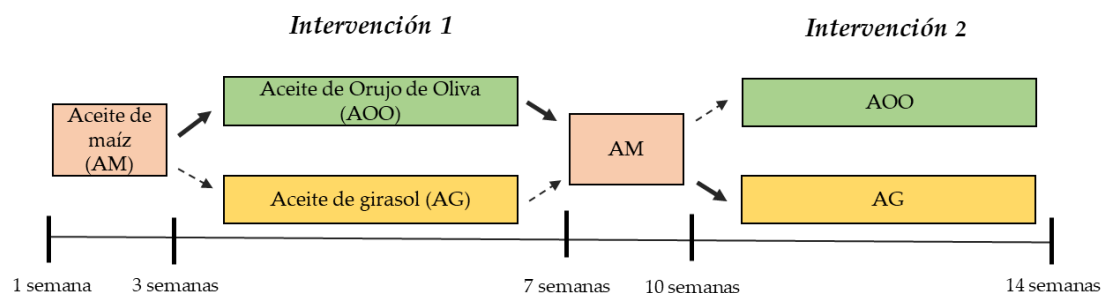


Figura 17. Diseño del segundo estudio de intervención con aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol (AG). Se utilizó aceite de maíz (AM) durante la etapa de basal y de lavado. Las líneas verticales indican las visitas/controles programados en el ensayo.

### 3.2. Reclutamiento, aleatorización e intervención

Como paso inicial para la realización de ambos estudios clínicos, fue necesario obtener la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda (Madrid). Para ello, se elaboró la documentación pormenorizada pertinente, incluyendo la descripción de la intervención, copia de la información que se proporcionaría a los voluntarios, encuestas a completar, consentimiento informado, etc., presentándose también al Subcomité de Bioética del CSIC.

Para el reclutamiento de voluntarios se realizó un cartel donde se especificaban los diferentes criterios de inclusión y exclusión, con el objetivo de poder difundir qué tipo de voluntarios podrían participar (Figura 18). La divulgación se realizó principalmente a través de las redes sociales (Facebook, Instagram, LinkedIn, etc.), así como colocando carteles en facultades y centros de investigación del entorno de la Ciudad Universitaria, informando a los alumnos después de algunas clases y a través de la página web del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Se organizaron sesiones informativas para las personas que mostraron interés en participar en el estudio, comunicando telefónicamente con las personas interesadas que no pudieron asistir a las reuniones. Tras obtener el consentimiento informado firmado por todos aquellos individuos decididos a participar en el estudio, los potenciales voluntarios fueron citados individualmente para realizar una entrevista inicial pormenorizada para conocer sus antecedentes dietéticos y médicos, a fin de asegurar que cumplieran los criterios de

inclusión y establecer su posible incorporación en el estudio. Posteriormente, se pidió a los voluntarios que facilitaran los resultados de una analítica sanguínea reciente o, en su defecto, se les citó para un análisis de sangre rutinario con la finalidad de poder clasificarlos en el grupo sano o de riesgo.

El tamaño muestral fue calculado con el programa G\*Power 3.1.9.7., donde la concentración de CT fue tomada como la variable principal. Otras premisas consideradas fueron: una potencia estadística del 80%, un nivel de significación de 0,05, dos colas, desviación estándar de 25, media de las diferencias pre-post de 15 unidades, y un tamaño del efecto de 0,54. Teniendo en cuenta todos estos parámetros, se estableció un tamaño muestral final de 30 voluntarios por grupo.

De este modo, en el primer ensayo se reclutaron 68 voluntarios, 31 normocolesterolémicos y 37 hipercolesterolémicos. En el segundo estudio se reclutaron 72 voluntarios, 33 normocolesterolémicos y 39 hipercolesterolémicos. De acuerdo con lo establecido en los criterios de inclusión, el grupo hipercolesterolémico presentó niveles de colesterol total (200 - 300 mg/dL; 5,17 - 7,76 mmol/L) y LDL-C en sangre altos (135 - 175 mg/dL; 3,49 - 4,53 mmol/L) y no estaban tomando ninguna medicación para tratarlo. Además, todos los voluntarios presentaron una edad comprendida entre 18 y 55 años, un IMC menor de 30 kg/m<sup>2</sup>, no padecían ninguna patología crónica ni estaban sometidos a ningún tratamiento médico, no eran fumadores ni vegetarianos, no tomaban ningún tipo de suplemento dietético y, para el caso de las mujeres, ni estaban ni sospechaban estar embarazadas y ni estaban en periodo de lactancia (Figura 18).

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Mujeres y Hombres Edad comprendida entre los 18 y 55 años CT y LDL-C <b>normal</b> (CT <200mg/dL y LDL-C <135 mg/dL) o <b>alto</b> (CT 200-300 mg/dL y LDL-C 135-175 mg/dL) Índice de masa corporal (IMC) < 30 kg/m <sup>2</sup>	Fumadores, vegetarianos o embarazadas/lactantes Padecer enfermedades agudas o crónicas Tomar vitaminas o suplementos dietéticos

Figura 18. Criterios de inclusión y exclusión establecidos en ambos estudios de intervención.

En ambos estudios, todos los voluntarios mantuvieron sus hábitos dietéticos y estilo de vida sin modificaciones durante las 14 semanas de duración de cada estudio.

La intervención consistió en sustituir el aceite que los voluntarios consumían habitualmente por 45 g/día (equivalente a 4-5 cucharadas) del aceite proporcionado en cada etapa de los estudios (AOO, AGAO o AG para el Estudio 1, y AOO, AG o AM para el Estudio 2), con el fin de cubrir el 20% de la ingesta energética diaria de grasas monoinsaturadas (equivalente a 44-67 g/día para 2000-3000 Kcal/día, respectivamente) de acuerdo a las recomendaciones de la SENC. Para ello, se les facilitó gratuitamente 1 L aceite/semana según la fase del estudio (etapa basal, de lavado o de intervención) para consumo familiar, a fin de garantizar que no se utilizara ningún otro aceite culinario. Asimismo, se restringió el consumo de otros alimentos compuestos fundamentalmente de grasa mono- o poliinsaturada (aceitunas, pipas de girasol, frutos secos, aguacate, margarinas, mantequillas y mayonesas, excepto si se preparaba con los aceites del estudio), para prevenir su consumo indiscriminado por parte de algún voluntario y evitar diferencias respecto al resto de participantes.

La asignación de los participantes a comenzar con AOO o con el aceite de control (AGAO para el estudio 1, y AG para el estudio 2) se realizó de forma aleatoria en una proporción de 1:1. La asignación de códigos a los participantes, la aleatorización y la distribución de los aceites fueron realizadas por diferentes miembros del equipo investigador utilizando el software Microsoft® Excel 2016 versión 16.0 (Washington, DC, Estados Unidos). Para cumplir con el criterio de cegamiento establecido en el diseño del estudio, los aceites se presentaron en el mismo tipo de botella, con tapones de distinto color. La correspondencia entre el color y el aceite en el estudio sólo la conocían los miembros del equipo investigador.

En ambos estudios, cada voluntario realizó un total de cinco visitas a la Unidad de Nutrición Humana (UNH) del ICTAN, teniendo en cuenta que acudieron antes y después de cada etapa (Figuras 16 y 17). En cada visita, los voluntarios acudieron en ayunas, proporcionando una muestra de orina de la primera micción de la mañana en botes estériles proporcionados previamente. Asimismo, entregaron los registros dietéticos de 24 h y 72 h cumplimentados. Seguidamente, se procedió a la medición de la tensión arterial y frecuencia cardíaca tras un reposo de 15 minutos, la extracción de sangre por

una enfermera colegiada, y se realizó el estudio antropométrico. Una vez finalizadas todas las mediciones, se proporcionó a los voluntarios el aceite correspondiente a la etapa en la que se encontraban, junto con instrucciones para su uso y un listado de alimentos que no podían consumir. Además, dentro del primer estudio, se evaluó la tonometría arterial periférica (PAT) en los voluntarios asignados al grupo de riesgo como método para evaluar la disfunción endotelial. Finalmente, en la última visita realizada por los voluntarios al final de ambos ensayos, se llevó a cabo una encuesta para conocer el grado de aceptación de los aceites empleados en cada intervención.

Durante todo el estudio los voluntarios dispusieron de fichas de incidencias y observaciones dónde anotaban cualquier circunstancia irregular o que consideraran oportuno comentar a los investigadores del equipo (p. ej. situaciones excepcionales como enfermedad, cambios drásticos en sus hábitos alimentarios o en la actividad física durante el período de intervención, etc.).

A continuación, se detallan las medidas y los distintos análisis realizados sobre las muestras biológicas obtenidas de los voluntarios.

#### **4. Presión arterial**

La presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD) se determinaron con un tensiómetro OMRON<sup>®</sup> M2 HEM-7121-E (OMRON HEALTHCARE Co., Ltd. Kyoto, Japón) en cada visita programada. Los participantes permanecieron sentados durante 15 minutos antes de la medición, que se realizó por triplicado en el brazo no dominante, esperando 5 minutos entre cada medida. En cada determinación, los participantes debían mantener las piernas sin cruzar y los pies apoyados en el suelo.

## 5. Medidas antropométricas

Distintos parámetros antropométricos fueron determinados en todas las etapas del estudio con el fin de conocer cómo el consumo prolongado de AOO, AGAO y AG podía afectar a la composición corporal de los voluntarios. La estatura y los perímetros corporales (cintura, cadera y brazo) se tomaron por triplicado con la ayuda de un tallímetro de pared (Soehnle Professional, GmbH) y una cinta métrica (Fisaude ADE, España), respectivamente. Estas medidas fueron registradas siguiendo el protocolo de la Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría (ISAK, de sus siglas en inglés International Society of the Advancement of Kinanthropometry).

El peso y el porcentaje de grasa corporal fueron estimados por bioimpedancia eléctrica tetrapolar monofrecuencia usando un analizador segmental de composición corporal Tanita® BC 601 con báscula digital incluida (Tanita Europe BV, Amsterdam, Países Bajos). A partir de los datos obtenidos de peso y talla se calculó el IMC de acuerdo con la siguiente fórmula:  $IMC = \text{peso}/(\text{altura})^2$ , expresado como  $\text{kg}/\text{m}^2$ .

## 6. Tonometría arterial periférica

La disfunción endotelial y la rigidez arterial fueron evaluadas por el método no invasivo de PAT en aquellos participantes asignados al grupo hipercolesterolémico en el Estudio 1. Para ello se empleó el dispositivo Endo-PAT 2000® (Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel). Esta valoración permite evaluar la relación entre la amplitud de onda del pulso digital en reposo y después de 5 minutos de oclusión de la arteria braquial.

Siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, este dispositivo aplica un manguito de presión que cubre las dos terceras partes distales de los dedos. Cuando el flujo sanguíneo es ocluido durante 5 minutos por la aplicación de un manguito de presión en el antebrazo, se produce una falta de riego sanguíneo en los dedos que induce hiperemia reactiva (aumento del flujo sanguíneo tras la oclusión de una arteria). Asimismo, el manguito posicionado en cada dedo de la mano es inflado, tanto para fijar el dispositivo al dedo como para medir el pulso y el volumen de los cambios de flujo en la falange distal. El brazo no ocluido se utilizó como control para registrar los posibles cambios en el tono vascular.

Los resultados obtenidos fueron analizados y calculados con el software Endo-PAT 2000<sup>®</sup>, que ofrece un valor de la función endotelial en dos formas: índice de hiperemia reactiva (RHI-PAT) y un índice similar tras la transformación logarítmica con un límite coincidente (LnRHI). Este último proporciona una mejor distribución de doble cara que el RHI; por esta razón los resultados en la presente Tesis Doctoral fueron presentados como índice LnRHI.

## **7. Cuestionarios**

### 7.1. Valoración de la ingesta dietética

Como se indica en la sección de intervención, los participantes debían mantener sus hábitos alimenticios y su estilo de vida sin cambios a lo largo de los estudios. En cada visita, se pidió a los participantes que cumplimentasen un recuerdo de 24 horas, correspondiente al día anterior a la visita, y un registro detallado de la ingesta de alimentos durante 3 días no consecutivos (72 horas, incluyendo dos días laborales y un festivo). En cada uno de los cuestionarios debían indicar los ingredientes, las unidades o la cantidad de alimentos ingeridos, así como la hora y el lugar donde comían. Para facilitar la interpretación de las medidas caseras y las raciones habituales, se facilitó a los voluntarios el Manual de Nutrición y Dietética de Medidas Caseras y Raciones Habituales de Consumo (Carbajal, 2013). El cumplimiento de las restricciones alimentarias y la correcta ingesta de aceite se controló mediante llamadas semanales y/o correos electrónicos a los participantes.

De todos los datos recogidos en los registros de 72 h se estudiaron los siguientes parámetros:

- Ingesta calórica total.
- Ingesta de macronutrientes: proteína, grasa y carbohidratos.
- Ingesta de micronutrientes: vitaminas A, D, E, K y C; selenio (de manera individual) y minerales totales (conjunto de calcio, hierro, yodo, sodio, potasio, fósforo, cloro, flúor, zinc, magnesio, manganeso, cobre, níquel, cromo y selenio).
- Fibra dietética.

Para la valoración de la dieta se empleó el programa DIAL<sup>®</sup> (Facultad de Farmacia-Universidad Complutense de Madrid y Alce Ingeniería).

## 7.2. Análisis grado de aceptación de los aceites

En la última visita de ambos estudios se realizó una encuesta para conocer el grado de aceptación de los aceites empleados en cada una de las intervenciones; es decir, AOO y AGAO para el estudio 1, y AOO y AG para el estudio 2. Para la elaboración y el diseño de dicha encuesta se contó con el apoyo de la Unidad de Servicio de Análisis Sensorial (USAS) del ICTAN. Esta encuesta fue realizada con la ayuda de un miembro del equipo investigador como entrevistador para minimizar el margen de error en las respuestas. Los participantes respondieron a las siguientes preguntas:

- Características organolépticas: sabor, olor y color (Valoración del 1 al 5, siendo el 1 “No me gusta nada” y el 5 “Me gusta mucho”)
- Técnicas culinarias: crudo, fritura y otras (Valoración del 1 al 5, siendo el 1 “muy malo en crudo, fritura y otras técnicas culinarias” y el 5 “muy bueno en crudo, fritura y otras técnicas culinarias”)
- ¿Comprarías este aceite para tu dieta habitual? (Respuesta: Sí /No)
- ¿Recomendarías este aceite? (Respuesta: Sí /No)
- Si tuviese efectos beneficiosos en salud ¿Lo comprarías? (Respuesta: Sí /No)
- Valoración global del aceite (puntuación del 1 al 10)

Para el análisis de los resultados se empleó el programa Microsoft<sup>®</sup> Excel 2016 software versión 16.0 (Washington, DC, USA).

## 8. Recolección de muestras sanguíneas

En cada visita a la UNH, a los voluntarios se les extraían cinco tubos de sangre obtenidos de la vena cubital por una enfermera colegiada y recogidos en tubos BD Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) con EDTA (ácido etilen diamino tetracético) o sin anticoagulante para separar el plasma y el suero, respectivamente. De los tres tubos de suero y los dos de plasma obtenidos, una muestra de suero y una de plasma se destinó a los laboratorios de análisis clínicos Unilabs para su posterior análisis bioquímico y hematológico. Para separar el plasma se centrifugó la sangre tras la extracción, mientras que para obtener el suero la sangre se dejó reposar durante 20-25 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación. Estas muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm, 4 °C (centrífuga Biofuge Primo R Haereus, IMLAB, Lille, Francia), se separaron en alícuotas y se almacenaron a - 80 °C hasta su análisis.

## 9. Determinaciones hematológicas y bioquímicas

El análisis hematológico y bioquímico de las muestras sanguíneas se realizó en los laboratorios Unilabs, siguiendo procedimientos analíticos clásicos. Así, se determinó el número de hematíes, hematocrito, concentración de hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) e índice de dispersión de hematíes (IDH). Respecto a la serie blanca, se realizó el análisis de leucocitos, linfocitos, monocitos, segmentados, basófilos y eosinófilos. Asimismo, se determinó el número de plaquetas y el volumen plaquetario medio.

La concentración de CT, TG y HDL-C, así como las Apo A1 y Apo B se determinaron siguiendo los métodos de referencia o los recomendados por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC), utilizando un analizador Roche Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las LDL y VLDL se calcularon según la fórmula de Friedewald y cols. (1972) [ $LDL-C = CT - HDL-C - (TG/5)$ ] y, además, se calcularon las relaciones Apo B/Apo A1, LDL/HDL y CT/HDL.

También se determinaron los valores de ácido úrico, creatinina y glucosa mediante técnicas espectrofotométricas estandarizadas, la concentración de proteína C reactiva (PCR) por un método turbidimétrico ultrasensible automatizado (AU2700 Biochemistry Analyser; Olympus) y las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) por espectrofotometría.

## 10. Determinaciones de biomarcadores de función endotelial

Para evaluar los efectos del consumo de los distintos aceites sobre biomarcadores de función endotelial se determinaron los niveles de E-selectina (ELISA Kit SEA029Hu), P-selectina (SEA569Hu) y eNOS (SEA868Hu) en las muestras de plasma obtenidas durante el estudio. Para el análisis de estas muestras se empleó la técnica ELISA, basada en el uso de anticuerpos ligados a enzimas específicas de los biomarcadores de interés. Todas las muestras fueron analizadas siguiendo los protocolos adjuntos en los correspondientes kits de Cloud-Clone Corp. (Katy, TX, EEUU).

La reacción enzimática que tiene lugar en el reconocimiento del analito cursa mediante cambio de color, cuya lectura espectrofotométrica se llevó a cabo a 450 nm en un lector de placas Bio-Tek<sup>®</sup> Synergy<sup>™</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, EEUU), termostaticado a 37 °C y controlado por el software BioTek<sup>®</sup>Gen5 software versión 2.01.14. Los tres biomarcadores fueron analizados por duplicado y los resultados fueron expresados como ng/mL.

## 11. Determinaciones de biomarcadores de inflamación

Para la determinación de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias [IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12(p70), IL-17], interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF)] e IL antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13), así como las quimioquinas MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1) y MIP-1 $\beta$  (proteína inflamatoria de macrófagos-1 beta) se empleó el kit Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) para su determinación por la técnica Multiplex. Esta técnica permite la cuantificación y detección simultánea de múltiples biomarcadores utilizando una metodología similar a la técnica ELISA en un

volumen reducido de muestra. De la misma forma, las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y vascular (VCAM-1) solubles se cuantificaron con el kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine ICAM-1 and VCAM-1 Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

Para llevar a cabo esta técnica, se emplearon muestras de suero y se analizaron en un lector de fluorescencia Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex operando con el software Bio-Plex Manager™ MP. Además, se contó con una estación de lavado Bio-Plex Pro Wash Station (Luminex Corporation, Austin, TX, EEUU). Las muestras fueron analizadas por duplicado y la concentración de los distintos marcadores expresada como pg/mL.

## 12. Determinación de capacidad antioxidante y daño oxidativo

El efecto del consumo de AOO, AGAO y AG sobre el estatus oxidativo de los voluntarios se estudió determinando la capacidad antioxidante en suero mediante tres métodos complementarios: ORAC, FRAP y ABTS. Además, se valoró el posible daño oxidativo a macromoléculas, determinando en las muestras de suero los niveles de LDLox y MDA como biomarcador de oxidación lipídica.

### 12.1. Ensayo ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity)

Esta técnica permite evaluar la capacidad antioxidante mediante un método fluorimétrico. La descomposición térmica de un azoderivado AAPH [(2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro; Sigma-Aldrich)] genera radicales peroxilo en el medio. Dichos radicales oxidan a la fluoresceína (sensor/marcador fluorescente), generando una pérdida de señal fluorescente en el medio. La presencia de antioxidantes en la muestra inhibe la oxidación de la fluoresceína, perdurando durante más tiempo la señal fluorescente.

Para la cuantificación de dicho marcador, las muestras de suero fueron diluidas en una concentración 1:500. Asimismo, fue necesario preparar disoluciones de patrón Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; Sigma-Aldrich) a distintas concentraciones (50, 25, 12,5 y 6,25  $\mu\text{M}$ ) para la realización de una recta de calibrado.

Las muestras y los patrones fueron diluidos en un tampón fosfato 75 mM (pH 7,4). En la placa multipocillo se añadieron 150  $\mu$ L de fluoresceína ( $8,25 \times 10^{-5}$  mM; Sigma-Aldrich) y 25  $\mu$ L de muestra a evaluar o Trolox. El blanco fue preparado con 150  $\mu$ L de fluoresceína ( $8,25 \times 10^{-5}$  mM) y 25  $\mu$ L de tampón fosfato.

Para la medición, se empleó un lector de placas Bio-Tek® Synergy™ HT Multi-Detection termostatzado a 37 °C, midiéndose la fluorescencia durante 90 minutos a una longitud de onda de excitación de 458 nm y 528 nm de emisión. Se emplearon placas de poliestireno negro para fluorescencia de fondo plano (BIOGEN RA-6018710).

En el cálculo de la capacidad antioxidante se tuvo en cuenta el rendimiento neto del área bajo la curva (ABC) y los resultados fueron expresados en equivalentes de Trolox (TE), un análogo de la vitamina E que se emplea como patrón de referencia para poder comparar los resultados obtenidos (Huang y cols., 2002; Moniruzzaman y cols., 2011). Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado.

## 12.2. Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El ensayo FRAP es un método espectrofotométrico que permite cuantificar el potencial antioxidante en las muestras de suero. Este método se basa en la reducción de hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) presente en el reactivo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina; Sigma-Aldrich) hasta la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en presencia de antioxidantes. Como consecuencia de esta reducción, se genera un cambio de color proporcional a la capacidad reductora de la muestra (Pulido y cols., 2000).

A diferencia del ensayo ORAC, las muestras de suero no precisaron dilución. Para la realización de la recta de calibrado, el patrón Trolox (0.025 g) fue disuelto en un volumen de 50 mL de tampón fosfato salino (PBS). A partir de esta solución se prepararon los puntos de la recta de calibrado. El reactivo FRAP se preparaba a diario mezclando 7,5 mL de tampón acetato, 2,5 mL de la solución de TPTZ 10 mM y 2,5 mL de la solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM (Panreac, P.A.). En cada pocillo de las placas de 96 pocillos no estériles con fondo plano transparentes (Thermo Fisher Scientific) se añadieron 10  $\mu$ L de muestra (Trolox, suero o PBS en los pocillos blancos), 30  $\mu$ L de agua destilada y 200  $\mu$ L de tampón acetato 0,3 M (pH 3,6).

Para la determinación de la absorbancia (a una longitud de onda de 595 nm) se empleó un lector de placa Bio-Tek® Synergy™ HT Multi-Detection durante 30 minutos. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{M}$  de TE. Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado.

### 12.3. Ensayo ABTS

Este método es una técnica espectrofotométrica que se basa en la cuantificación de la decoloración del radical  $\text{ABTS}^+$ . El compuesto ABTS (2,2'-azobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato; Sigma-Aldrich) en presencia de persulfato de potasio da lugar al radical catiónico  $\text{ABTS}^+$ , un cromóforo verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 730 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra neutraliza estos radicales ( $\text{ABTS}^+$ ) mediante la transferencia de electrones u átomos de hidrógeno, lo que produce la decoloración del catión radical ( $\text{ABTS}^+$ ) y, por tanto, la disminución de la absorción espectrofotométrica (Re y cols., 1999; Shahidi y Zhong, 2015).

Para llevar a cabo esta técnica, las muestras de suero fueron diluidas en una proporción 1:25. A partir de la solución obtenida tras mezclar 0,025 g de patrón Trolox en 100 mL de PBS se preparó la recta patrón de concentraciones entre 50-800  $\mu\text{M}$ . En cada uno de los pocillos de placas de plástico transparente y fondo plano (Thermo Fisher Scientific) se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de muestra o patrón, 10  $\mu\text{L}$  PBS en los pocillos en blanco y 230  $\mu\text{L}$  de agua destilada en todos los pocillos y 60  $\mu\text{L}$  de reactivo ABTS.

Para cuantificar la decoloración del radical catiónico se empleó un lector de placa Bio-Tek® Synergy™ HT Multi-Detection durante 30 minutos. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{M}$  de TE. Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado.

### 12.4. Niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox)

Para la determinación de los niveles circulantes de LDLox se emplearon muestras de suero, analizándose mediante ELISA empleando el kit Low Density Lipoprotein (LDL); N° SEB107Mu; Kit Cloud-Clone Corp. (Katy, TX, EEUU), cuantificando espectrofotométricamente en un lector de placas Bio-Tek® Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader controlado por el software BioTek® Gen5 software versión

2.01.14. Las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se expresaron en unidades de concentración ng/mL.

#### 12.5. Niveles de Malondialdehído (MDA)

La interacción de los radicales libres con los lípidos séricos y tisulares se denomina peroxidación lipídica, proceso que da lugar a varios metabolitos de degradación, entre ellos, MDA. Para conocer el contenido de MDA se aplicó un método de HPLC desarrollado por nuestro grupo (Mateos y cols., 2005).

Las muestras de suero (250  $\mu$ L) fueron incubadas con 50  $\mu$ L de hidróxido sódico 6M en un baño de agua a 60 °C durante media hora. Posteriormente, se añadió 125  $\mu$ L de ácido perclórico 35% (v/v) y se centrifugó a 2800 rpm durante 10 minutos. Seguidamente se extrajeron 350  $\mu$ L de sobrenadante, añadiendo 35  $\mu$ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH; Sigma-Aldrich) y manteniendo durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz en viales topacio para cromatografía.

Para la curva de calibrado se disolvieron 25  $\mu$ L de 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP; Sigma-Aldrich) en 100 mL de agua destilada para obtener una concentración de 1 mM, tomando 1 mL para disolverlo en 50 mL de ácido sulfúrico al 1% e incubarlo durante 2 horas a temperatura ambiente. Esta disolución resultante de MDA contenía una concentración de 20 nmol/L, a partir de la cual se prepararon las distintas diluciones en ácido sulfúrico al 1% hasta obtener concentraciones entre 0.05-10 nmol/mL.

Para el análisis de las muestras, se utilizó un equipo HPLC serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) y una columna Nucleosil 120 C18 (125 mm x 0,46 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m, TeknoKroma, Barcelona, España). Las muestras se eluyeron isocráticamente, con una mezcla de ácido acético al 0,2% (v/v) en agua desionizada y acetonitrilo (62:38 v/v), a un caudal de 0,8 mL/min a temperatura ambiente. El tiempo de análisis por muestra fue de 40 minutos y los cromatogramas se adquirieron a 310 nm. Las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se expresaron en nmol/mL.

### 13. Determinación de biomarcadores de diabetes y obesidad

Para evaluar los efectos del consumo de los aceites estudiados sobre distintos biomarcadores de diabetes y obesidad, se cuantificaron las hormonas insulina, péptido C, glucagón, las incretinas polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), la grelina y las adipocinas leptina, resistina, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), visfatina, adiponectina y adiposina mediante la técnica Multiplex previamente descrita.

Para ello se emplearon muestras de suero y el kit Bio-Plex Pro™ Human Diabetes Panel 2-Plex para la cuantificación de adiponectina y adiposina, y el kit Pro™ Human Diabetes Panel 10-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) para el resto de biomarcadores. La lectura de la placa fue realizada con el lector de fluorescencia Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex operando con el software Bio-Plex Manager™ MP. Además, se empleó una estación de lavado Bio-Plex Pro Wash Station. Las muestras fueron analizadas por duplicado y expresadas como pg/mL.

Por otra parte, la concentración de glucosa, insulina y hemoglobina glicosilada (HbA1c) fueron determinadas junto con los biomarcadores hematológicos y bioquímicos siguiendo los procedimientos analíticos clásicos en los laboratorios de análisis clínicos Unilabs, a partir de las muestras de suero obtenidas en cada visita.

Usando los valores obtenidos de glucosa e insulina en ayunas se evaluó la resistencia a la insulina aplicando un modelo matemático conocido como HOMA (de sus siglas en inglés “Homeostasis Model Assessment”) propuesto por Mathews y cols. (1985), donde la concentración de glucosa e insulina en ayunas permite evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y la actividad de las células beta pancreáticas (HOMA-β).

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Glucosa (mg/dL)} \times \text{Insulina (mU/L)}] / 405$$

$$\text{HOMA-}\beta = [(360 \times \text{Insulina (mU/L)}) / (\text{Glucosa (mg/dL)} - 63)]$$

Otro índice ampliamente empleado es la determinación de la sensibilidad a la insulina mediante el índice QUICKI (de sus siglas en inglés “Quantitative Insulin Check Index”) (Katz y cols., 2000), que se basa en un modelo logarítmico que también se calcula a partir de las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno mediante la siguiente ecuación:

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log \text{Insulina (mU/L)} + \log \text{Glucosa (mg/dL)}]$$

### 13. Estadística

Para el análisis estadístico de los resultados se tuvieron en cuenta dos efectos fijos, la pertenencia al grupo (normocolesterolémico o hipercolesterolémico) y la intervención dietética (consumo de AOO y los aceites de control AGAO y AG, medidas repetidas), y un efecto aleatorio, el orden de ingesta de los aceites del estudio (dentro de cada grupo).

Los modelos estadísticos aplicados en ambos estudios fueron:

1. Modelo lineal general de medidas repetidas para comparar la ingesta de energía y nutrientes a lo largo del estudio. En cada grupo [normocolesterolémico (N) e hipercolesterolémico (H)], se compararon la etapa basal, la etapa inicial (pre-tratamiento) y la etapa final (post-tratamiento) con el AOO y los aceites control, AGAO y AG. Los resultados fueron mostrados en las tablas como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).
2. Modelo lineal mixto aplicado en las tasas de cambio [(valor final - valor inicial) / valor inicial] de cada variable. Este modelo estadístico permite que los datos presenten una variabilidad correlacionada y no constante con el fin de considerar el orden de ingesta de los aceites. Para entender mejor los resultados del estudio, este modelo estadístico se aplicó también a los valores medios iniciales (pre-tratamiento) y finales (post-tratamiento). El modelo estadístico fue completamente factorial, grupo (N/H), aceite de tratamiento (AOO, AGAO o AG) y la interacción grupo\*tratamiento, considerando el orden de ingesta como un

efecto aleatorio. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), menos la tasa de cambio que fue expresada como porcentaje.

Antes de proceder al análisis estadístico, se verificó la normalidad de la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se llevó a cabo un análisis de Box-Plot en todas las variables. Además, se realizó la prueba de Bonferroni (dentro de cada grupo) para comparar por pares el efecto de la ingesta de cada aceite (A00, AGAO o AG). El nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$ . Los datos fueron analizados con el software SPSS (versión 27.0; SPSS, Inc., IBM Company).



# RESULTADOS



Los resultados derivados de los dos estudios de intervención nutricional realizados tanto en población sana (sujetos normocolesterolémicos), como con riesgo cardiovascular moderado (voluntarios hipercolesterolémicos), han sido publicados individualmente, comparando el AOO con AGAO (artículo I) y con AG (artículo II). Asimismo, los resultados de ambos estudios se combinaron y publicaron conjuntamente (artículo III). No obstante, en todos los casos hubo resultados que no se incluyeron en las publicaciones y que se han añadido en este capítulo con el epígrafe de “Resultados no publicados”.

## **Artículo I.- Evaluación del efecto en salud del aceite de orujo de oliva en comparación con el aceite de girasol alto oleico en sujetos sanos y con riesgo cardiovascular.**

### **1.1. Resumen**

La composición del AOO, rico en ácido oleico y con contenidos notables de componentes minoritarios bioactivos, cuyas propiedades en salud han sido evidenciadas en diferentes estudios *in vitro* y preclínicos, hace de este aceite una fuente grasa de gran potencial en nuestra dieta. Ante la inexistencia de ensayos clínicos en humanos en los que se abordaran las propiedades del AOO en salud, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del consumo regular de AOO en biomarcadores de salud cardiovascular y patologías asociadas (hipertensión, diabetes y obesidad), mediante el desarrollo de un ensayo clínico aleatorizado, cruzado, ciego y controlado en 34 sujetos normocolesterolémicos y 30 sujetos moderadamente hipercolesterolémicos que consumieron 45 g/día de AOO o de AGAO (aceite de control) durante 4 semanas.

Los resultados derivados de esta investigación mostraron que el AOO reducía significativamente las concentraciones séricas de LDL-C ( $p=0,003$ ), Apo B ( $p=0,022$ ), y la relación LDL/HDL ( $p=0,027$ ) en ambos grupos (sujetos normo- e hipercolesterolémicos). Asimismo, en el grupo normocolesterolémico, el péptido-C, los índices de resistencia (HOMA-IR) ( $p=0,015$ ) y sensibilidad (QUICKI) ( $p=0,001$ ) a la insulina, y el perímetro de cadera ( $p=0,009$ ) también mostraron una respuesta satisfactoria (aumento del índice QUICKI y disminución de péptido-C, HOMA-IR y perímetro de cadera) tras el consumo prolongado de AOO. En cambio, estos efectos no fueron observados tras el consumo de AGAO, salvo el perímetro de cadera, que también mostró una respuesta descendente. La presión arterial, la tonometría arterial periférica, la función endotelial y los biomarcadores de inflamación, capacidad antioxidante y peroxidación lipídica no se vieron afectados tras la intervención dietética con el AOO y el AGAO. Por último, de acuerdo con los cuestionarios realizados para conocer el grado de satisfacción de los aceites empleados en el presente ensayo, se puede afirmar que, en términos generales, el AOO tuvo una mejor aceptación que el AGAO.

Por tanto, se puede concluir que el consumo regular de AOO en la dieta podría tener acciones hipolipemiantes en sujetos con riesgo cardiovascular, así como en consumidores

sanos, contribuyendo a la prevención de la ECV. Además, los positivos efectos observados en el grupo de sujetos sanos en parámetros e índices relacionados con la resistencia y la sensibilidad a la insulina pondrían de manifiesto el posible papel beneficioso de este aceite en la modulación de diferentes marcadores relacionados con la diabetes.

## 1.2. Artículo I

<b>Título</b>	Olive pomace oil can improve blood lipid profile: a randomized, blind, crossover, controlled clinical trial in healthy and at-risk volunteers
<b>Autores</b>	Susana González-Rámila, Beatriz Sarriá, Miguel Ángel Seguido, Joaquín García-Cordero, Raquel Mateos y Laura Bravo-Clemente
<b>Revista</b>	European Journal of Nutrition
<b>Año</b>	2022
<b>DOI</b>	10.1007/s00394-022-03001-y



## Olive pomace oil can improve blood lipid profile: a randomized, blind, crossover, controlled clinical trial in healthy and at-risk volunteers

Susana González-Rámila<sup>1</sup> · Beatriz Sarriá<sup>1</sup> · Miguel A. Seguido<sup>1</sup> · Joaquín García-Cordero<sup>1</sup> · Raquel Mateos<sup>1</sup> · Laura Bravo<sup>1</sup>

Received: 30 January 2022 / Accepted: 7 September 2022  
© The Author(s) 2022

### Abstract

**Purpose** This study aimed to assess the effect of dietary consumption of olive pomace oil (OPO) on blood lipids (primary outcome) and other cardiovascular disease (CVD) risk factors (blood pressure, inflammation and endothelial function as secondary outcomes).

**Methods** A randomized, controlled, blind, crossover intervention was carried out in healthy and at-risk (hypercholesterolemic) subjects. Participants consumed daily 45 g of OPO or high-oleic acid sunflower oil (HOSO) as control oil during 4 weeks.

**Results** OPO significantly reduced low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C;  $P=0.003$ ) and apolipoprotein B (Apo B;  $P=0.022$ ) serum concentrations, and LDL/HDL ratio ( $P=0.027$ ) in healthy and at-risk volunteers. These effects were not observed with HOSO. Blood pressure, peripheral artery tonometry (PAT), endothelial function and inflammation biomarkers were not affected.

**Conclusions** Regular consumption of OPO in the diet could have hypolipidemic actions in subjects at cardiovascular risk as well as in healthy consumers, contributing to CVD prevention.

**Clinical trial registry** NCT04997122, August 8, 2021, retrospectively registered.

**Keywords** Olive pomace oil · Oleic acid-rich sunflower oil · Cardiovascular health · Lipid profile · Endothelial function

### Introduction

Morbidity and mortality from cardiovascular diseases (CVD) are increasing and represent a major public health problem worldwide [1]. CVD are caused by multiple factors, variable such as arterial hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus (T2D), smoking or physical inactivity, with genetics, sex and age being non-modifiable factors also playing a role in the pathophysiology of CVD. It is known that a healthy diet and physical exercise can modulate the risk of CVD [1, 2]. In this regard, the Mediterranean Diet (MD) is considered a model of healthy eating, associated with longer life expectancy and with protective effects against chronic diseases [3].

Olive oil is an essential component of the MD, being its primary fat source [3]. Depending on the processing of the olives, different categories of olive oil are obtained: extra virgin (EVOO), virgin (VOO), refined (ROO) olive oils, and olive pomace oil (OPO), all having a high content of monounsaturated fatty acids (MUFA), mainly oleic acid. The phenolic content of EVOO and VOO make these oils one of the best sources of dietary fat, with protective effects against CVD, inflammation and cancer [3, 4]. However, the concentration of phenolic compounds is lower in ROO and OPO due to the refining process applied to both oils. OPO is obtained from the waste product remaining after mechanical extraction of VOO, composed of the olive skin, pulp and stone [5]. Despite its lower content in phenolic compounds, OPO is rich in other bioactive compounds like squalene, pentacyclic triterpenes (oleanolic (OA) and maslinic (MA) acids, erythrodiol and uvaol), tocopherols, sterols and aliphatic fatty alcohols [6]. Numerous in vitro and preclinical studies have been conducted with one or more of these so-called minor components of OPO, offering promising results

✉ Laura Bravo  
lbravo@ictan.csic.es

<sup>1</sup> Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain

on different cardiometabolic traits [7–9]. However, research on the health effects of OPO in humans is limited to the assessment of some pure minor components administered as drugs or food supplements [10–12] or as functional VOO enriched in some triterpenes [13, 14], yet to this date the effect of consuming OPO in the diet has not been studied.

To this end, an intervention study has been carried out to assess the possible beneficial role of consuming OPO as the main source of fat in the diet on serum lipid concentrations (primary outcome) and other biomarkers of cardiovascular health such as blood pressure, endothelial function and inflammation (secondary outcomes) in at-risk (hypercholesterolemic, HC) subjects. To further explore the potential effects of OPO, healthy normocholesterolemic (NC) volunteers were also included in the study.

## Materials and methods

### Study design and outcomes

The study was a randomized, blind, crossover, controlled clinical trial in free-living subjects. It consisted of two 4-week interventions with OPO and high-oleic acid sunflower oil (HOSO), preceded each by 3-week run-in or wash-out periods. The study timeline is shown in Supplementary Fig. 1S. HOSO was used as control oil because it has a similar MUFA content than OPO but with a different profile of minor components. During run-in and wash out, volunteers consumed sunflower oil (SO) and followed the same food restrictions indicated below.

The primary study outcomes were changes in fasting serum concentrations of total (TC) or low-density lipoprotein (LDL-C) cholesterol or triglycerides (TG) in at-risk HC subjects. Secondary outcomes included changes in biomarkers of endothelial function, such as concentrations of E- and P-selectin, intercellular (ICAM-1) and vascular (VCAM-1) cell adhesion molecules, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and, in the HC subjects, changes in peripheral artery tonometry (PAT). Other secondary outcomes were changes in systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure and in inflammatory biomarkers.

### Participants

Participants were men and women aged 18–55 years with a body mass index (BMI) between 18 and 25 kg/m<sup>2</sup> selected on the basis of fasting serum TC and LDL-C concentrations. Specific inclusion criteria for at-risk volunteers were TC concentrations between 200 and 300 mg/dL and LDL-C between 135 and 175 mg/dL. Healthy volunteers had TC concentrations below 200 mg/dL and LDL-C below 135 mg/dL. Exclusion criteria included suffering from acute or

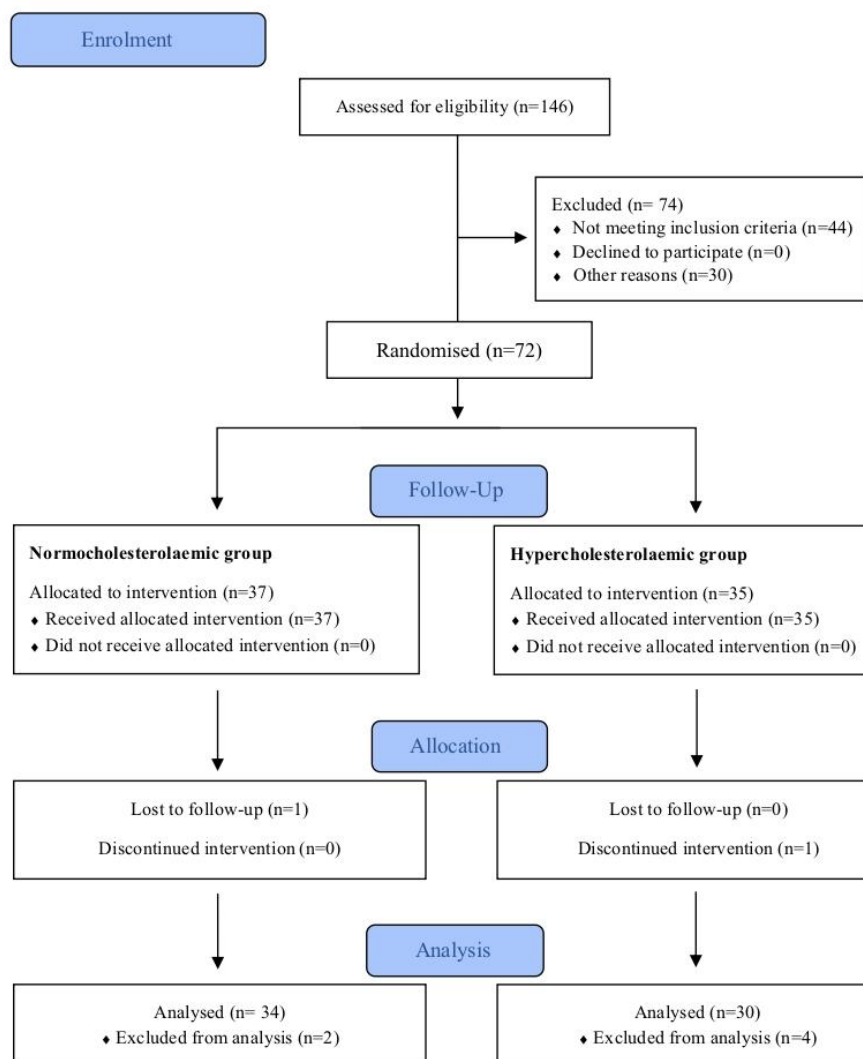
chronic pathologies, except hypercholesterolemia for the risk group, having digestive disorders/pathologies (gastric ulcer, Crohn's disease, etc.), smoking, pregnant women, vegetarians, on antibiotic treatment three months before starting the study or taking medication, hormones, vitamins or dietary supplements.

Subjects were recruited between November 2017 and January 2018 at the Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN). Recruitment was carried out mainly at the campus of Complutense University of Madrid (UCM) by placing flyers in the faculties, research institutes, and through talks after lectures, also through websites and internet. Potential volunteers were informed by phone, e-mail or in person at ICTAN. Subjects who met the inclusion criteria were invited to an on-site visit and interviewed about their medical condition and dietary habits. They also provided a recent blood analysis to confirm TC concentrations or referred to a collaborating laboratory (Unilabs S.L., Madrid) for this analysis. This biomarker (TC concentration) was the main variable for allocating participants in the normocholesterolemic or hypercholesterolemic groups. Thus, of the 146 subjects interviewed, 72 volunteers were recruited, corresponding to 37 healthy subjects (NC group) and 35 at-risk subjects (HC group) (Fig. 1).

Randomization of participants was done by generating random numbers using Microsoft® Excel 2016 program. It was controlled by the health status (i.e. NC or HC) and within each group, subjects were allocated (to the OPO or HOSO interventions) to sequence order in a 1:1 ratio, due to the crossover design of the study. Assignment of codes to participants, randomization and allocation to each oil were carried out by different team members. Samples were coded according to the study visit number to conceal treatment allocation during handling and analysis. Oils (OPO, HOSO and SO) were bottled in un-marked bottles with different cap colours. Participants were blinded to the type of oil they consumed in each intervention phase. They were habitual consumers of VOO or EVOO and were not familiar with OPO and HOSO. Therefore, it can be assumed they were not able to infer which oil was used in each intervention stage despite differences in colour and taste of OPO and HOSO.

To estimate sample size, the G\*Power 3.1.9.7 program was used. We considered TC concentration as the main variable and that the study design (randomized, blind, crossover, controlled intervention), in which the same subjects consumed the test (OPO) and control (HOSO) oils. Other premises considered were differences by treatment, a statistical power of 80%, a level of significance of 0.05, two tail, standard deviation of 25, mean of pre-post differences of 15 units, and an effect size of 0.54. Considering all these parameters, a final sample size of 30 volunteers was established for group. Finally, the number of participants were NC (normocholesterolemic) = 34 and HC (hypercholesterolemic) = 30.

**Fig. 1** Study flowchart according to CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials)



## Interventions

The intervention was conducted during April–July 2018 at the Human Nutrition Unit (HNU) of ICTAN. Participants consumed 45 g/d of the corresponding oil (OPO or HOSO, and SO during run-in and wash-out, equivalent to 4–5 tablespoons). This amount of oil was calculated considering the nutritional objective established by the Spanish Society for Community Nutrition for the adult population, that recommends that MUFA intake covers 20% of the daily energy intake (equivalent to 44–67 g/d for 2000–3000 kcal/d, respectively) and assuming that no other oils were consumed during the study and that the intake of MUFA-rich foods was restricted (see below). Volunteers were asked to maintain their dietary and lifestyle habits unchanged during the study, replacing their usual cooking oil by the one provided in each

phase of the study. They could use the oil for cooking, baking, frying, or raw as salad dressing or on toasts. One litre of the oil corresponding to each phase (OPO, HOSO or SO) was provided to each volunteer per week for family use, thus ensuring no other source of fat was used. Consumption of foods rich in mono- and polyunsaturated fat (olives, sunflower seeds, nuts, avocado, margarine, butter and mayonnaise, except if prepared with the study oils) was restricted.

During the study, participants attended the HNU five times. On week 1, before run-in, baseline characteristics of volunteers were recorded, measuring blood pressure and basic anthropometric parameters (height, weight and waist circumference). A fasting blood sample was obtained to measure basal biochemical and haematological parameters. Volunteers handed-in a 72 h detailed food intake record to obtain information on their basal dietary habits.

Subsequent visits corresponded to the initial and final time of each 4-week intervention (Fig. 1S), when fasting blood samples were collected, blood pressure was measured, and body weight was controlled. Only in the HC group, PAT was measured.

### Dietary control and compliance

In the last week of each intervention and run-in/wash-out stages, volunteers were asked to complete a 24 h dietary questionnaire corresponding to the day before each control visit, and previously a 72 h detailed food intake record. Total calories, macronutrients, micronutrients and dietary fibre (DF) intake were evaluated using the program DIAL (Faculty of Pharmacy, UCM, Madrid, Spain).

Compliance with the food restrictions and correct intake of oils was controlled by weekly calling or emailing participants. Volunteers were provided with an incident and observation sheet where they could note down any anomalies or irregular developments.

### Blood collection and biochemical analysis

After an overnight fast, 25 mL of blood was collected in BD Vacuette® tubes (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) with EDTA or without anticoagulant to obtain plasma and serum, respectively, that were separated by centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Biochemical analysis in serum was performed following reference procedures recommended by the Spanish Society of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology. Lipid metabolism biomarkers were determined using a Roche Cobas Integra 400 plus analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). TC, TG and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined, along with apolipoproteins A1 (Apo A1) and B (Apo B). LDL and VLDL (very low-density lipoprotein) were calculated according to Friedewald formula, and Apo B/Apo A1, LDL/HDL and TC/HDL ratios were calculated [15]. Alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) were analysed according to standard spectrophotometric procedures [16].

### Blood pressure

SBP and DBP were determined in triplicate with an OMRON® M2 HEM-7121-E sphygmomanometer (OMRON HEALTHCARE Co. Ltd., Kyoto, Japan) after resting in a sitting position for a minimum of 15 min and waiting 5 min between measurements.

### Endothelial function

Plasma concentrations of E-selectin (SEA029Hu), P-selectin (SEA569Hu) and eNOS (SEA868Hu) were determined by ELISA (Cloud-Clone Kit Corp., Katy, TX, USA) using a BioTek® Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader controlled by BioTek® Gen5 software version 2.01.14 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Circulating concentrations of ICAM-1 and VCAM-1 were determined in serum with Bio-Plex® Pro Human Cytokine ICAM-1 and VCAM-1 kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a MAGPIX™ Multiplex fluorescence reader operating with the Bio-Plex Pro Wash Station and the Bio-Plex Manager™ MP software for data processing (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Considering that PAT is usually reduced in individuals with cardiovascular risk factors, the hyperemic response was assessed only in the HC subjects by measuring pulsatile arterial volume changes by finger plethysmography using an Endo-PAT 2000® equipment (Itamar Medical, Caesarea, Israel). Volunteers rested in a supine position for at least 10 min before starting measurements of finger pulse wave amplitude (PWA) pre- and post-occlusion of the blood flow in the study arm. The reactive hyperaemia index (RHI) was calculated as the ratio of PWA during reactive hyperaemia vs baseline [17]. RHI values were transformed into natural logarithms (lnRHI). Values below 0.51 and above 0.51 were defined as abnormal and normal, respectively.

### Inflammatory biomarker

Serum samples were used to determine circulating concentrations of the cytokines interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), and tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 $\beta$ ), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), and granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) in serum samples using the Bio-Plex® Pro Human Cytokine 17-plex Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in the MAGPIX™ Multiplex fluorescence reader and Bio-Plex Manager™ MP software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). High-sensitive C-reactive protein (CRP) was measured in serum with an automatized ultrasensible turbidimetric method (AU2700 Chemistry Analyzer, Olympus Corp., Japan).

## Chemical characterization of the study oils

The oils used in the study were provided by Interprofesional del Aceite de Orujo de Oliva (ORIVA) and analysed according to standardized methods: ISO 12228-2:2014 method for the determination of sterols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex V for triterpenic alcohols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex XIX for aliphatic alcohols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex X for fatty acids; and ISO 9936:2016 for tocopherols and tocotrienols. Triterpenic acids were analysed following the method of Pérez-Camino & Cert [18], and squalene was determined by gas chromatography [19]. Phenols were analysed by high-performance liquid chromatography according to Mateos et al. [20]. Supplementary Table 1S shows the detailed composition of the oils. OPO and HOSO were rich in MUFA, with an oleic acid (C18:1n9) content of 71.0% and 76.5%, respectively. SO is predominantly a polyunsaturated fat, with a linoleic acid (C18:2n6) content of 58.6%, also presenting relevant amounts of C18:1n9 (29.6%). Tocopherols and sterols were higher in HOSO (583 mg/kg and 3040 mg/kg, respectively) and SO (562 mg/kg and 3315 mg/kg, respectively) than OPO (389 mg/kg tocopherols and 2839 mg/kg sterols). However, OPO showed a higher content of aliphatic alcohols (978 mg/kg), squalene (799 mg/kg), triterpenic acids (196.5 mg/kg), and triterpenic alcohols (886.6 mg/kg) compared to the low or no content of these minor components in HOSO (32 mg/kg aliphatic alcohols, 87 mg/kg squalene and < 2 mg/kg triterpenic acids and alcohols) and SO (26 mg/kg aliphatic alcohols, 117 mg/kg squalene and < 2 mg/kg triterpenic acids and alcohols) (Supplementary Table 1S).

## Statistical method

For the statistical design, the following factors were taken into account as two fixed effects: group (normocholesterolemic/hypercholesterolemic) and treatment (OPO/HOSO, repeated measures), and a random effect to consider the order of oil intake (starting with OPO or HOSO within each group).

## Statistical models

The statistical models applied for analyzing the results of this study were:

1. General linear repeated measures model to study energy, macronutrient and micronutrient intake throughout the study, considering that the order of intake of the test and control oils did not matter since it would not affect the overall dietary pattern of the volunteers. In each group (normocholesterolemic and hypercholesterolemic), baseline, initial

(pre-treatment) and final (post-treatment) results with OPO and HOSO were compared. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

2. A linear mixed model was applied to the relative changes from initial [(final value–initial value)/initial value] of each variable. This statistical model allows the data to present a correlated and non-constant variability to take into account the order of intake of the oils. The statistical model was full factorial, considering group (normocholesterolemic/hypercholesterolemic), treatment oil (OPO and HOSO) and interaction group\*treatment, order of intake was a random effect. Results are shown as relative changes from initial value  $\pm$  standard deviation (SD) and are expressed as a percentage.

The initial (pre-treatment) mean values were included in the tables as a reference value for relative change from the initial. All measurements (except dietary control) were performed at least in duplicate unless otherwise stated. Before statistical analysis, data normality of distribution was verified by the Kolmogorov–Smirnov test and a boxplot analysis was performed for all variables. In addition, the Bonferroni test (within each group) was performed to compare pairwise the effect of the intake of each oil (OPO and HOSO). The significance level was set at  $P < 0.05$ . Data were analysed using SPSS software (version 27.0; SPSS, Inc., IBM Company).

## Results

### Participants' characteristics, dietary control and compliance

Although variability due to sex was not an objective of the present study, we aimed at recruiting a similar number of men and women; thus, of the 72 volunteers recruited, 35 were men and 37 women, yet finally more women (34) than men (30) completed the study. One NC volunteer and one HC participant withdrew due to personal reasons. Thus, 36 NC and 34 HC subjects completed the study; however, 2 NC and 4 HC participants were excluded from data analysis due to abnormal values in their blood tests (e.g. very high aminotransferase, CRP or TG concentrations at some control tests). Thus, 64 volunteers completed the study and were analysed (Fig. 1). Due to technical reasons, E-selectin could only be analysed in samples from 17 NC and 16 HC patients. The baseline characteristics of the participants who completed the study are shown in Table 1. No adverse events were reported.

Table 2 shows energy, macronutrient, DF, and micronutrient intake. Macronutrient and energy intake remained constant, with no statistically significant differences due to the consumption of the different oils ( $P < 0.05$ ). Mean energy

**Table 1** Baseline characteristics of participants

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 34	Hypercholesterolemic <i>n</i> = 30
Men, <i>n</i>	13	17
Women, <i>n</i>	21	13
Age, y	35 ± 70	44 ± 52
BMI, kg/m <sup>2</sup>	24 ± 17	24 ± 17
Waist circumference, cm	77 ± 12	83 ± 12
Total-cholesterol, mg/dL	177 ± 29	239 ± 29
LDL-cholesterol, mg/dL	100 ± 23	150 ± 35
Systolic blood pressure, mmHg	118 ± 12	123 ± 12
Diastolic blood pressure, mmHg	73 ± 12	78 ± 12

Values represent mean ± SD. *BMI* body mass index, *LDL* low-density lipoprotein

intake throughout the dietary intervention ranged from 2019 to 2261 kcal/d, which was slightly below normal limits for healthy adults (2185–3000 kcal/d) according to the recommended intakes for the Spanish population [21]. Protein, carbohydrate and fat represented 17.4%, 38.7%, and 39.9%, respectively, of total caloric intake. According to the recommended daily intake and nutritional objectives for the Spanish population, macronutrients were not within reference ranges of 10–15% for proteins, 50–60% for carbohydrates and < 35% for lipids [21].

Baseline data showed that volunteers' habitual diet was rich in MUFA, with high intake of saturated fatty acids (SFA), between 24 and 33 g/d (equivalent to 11–13% of total energy, higher than the 7% recommended intake). SFA intake showed significant differences ( $P=0.006$ ) after the intervention with OPO and HOSO, decreasing in comparison with baseline values. As expected, MUFA intake decreased after consumption of SO during run-in/wash-out in both groups ( $P<0.001$ ), as shown by the MUFA values at the beginning of each intervention (between 28 and 32 g/d, equivalent to 11.8% and 13.5% of the total energy, respectively). However, values returned to those of the basal diet after the dietary intervention with OPO (45 g/d and 43 g/d, equivalent to 18.9% and 18.1% of the total energy in the NC and HC groups, respectively) and HOSO (46 g/d equivalent to 19.3% of total energy in the NC and HC groups) recovering recommended values of MUFA intake (> 17%). As for polyunsaturated fatty acids (PUFA), consumption of SO, rich in linoleic acid, increased the total intake of PUFA ( $P<0.001$ ) after run-in/wash-out (between 28 g/d and 31 g/d, equivalent to 11.8% and 13.0% of the total energy, respectively), returning to basal, normal intakes (3–6% of total energy) during OPO (13 g/d and 12 g/d, equivalent to 5.5% and 5.0% of the total energy in the NC and HC groups, respectively) and HOSO (11 g/d and 10.3 g/d, equivalent to 4.6% and 4.3% of the total energy in the NC and HC groups,

respectively) interventions. There were no significant effects of OPO and HOSO on cholesterol and DF, with intakes close to recommended values (< 300 mg/d for cholesterol and 25–30 g/d for DF). Vitamin and mineral intake remained constant, except for vitamin E. In both groups of volunteers, basal intake of Vitamin E was below values recommended for the Spanish adult population, set at 13 and 11 mg/day for men and women, respectively [21]. The intake of vitamin E increased during the intervention, with values ranging between 17 and 28 mg/d, showing significant variations due to the effect of the oil ( $p<0.001$ ) (Table 2). This higher intake of vitamin E reflected the  $\alpha$ -tocopherol content of the oils (OPO, HOSO and SO) (Table 1S). The pattern of lipids, fatty acid and vitamin E consumption suggests good compliance with the intervention and dietary recommendations.

### Lipid profile and liver function

The effect of dietary treatment on volunteers' lipid profile is shown in Table 3. As can be seen, no statistically significant differences were observed in the interaction of oil with group for any of the parameters, including VLDL ( $P=0.058$ ), which was close to reaching the significance level.

Intervention for 4 weeks with OPO showed significant changes ( $P=0.003$ ) on LDL-C, with a decrease of 2.7% in NC and 4.3% in HC. In turn, HOSO resulted in increased rates of around 4% LDL-C in both groups. Apo B also showed a significant decrease ( $P=0.022$ ) after OPO consumption in NC ( $-2.9 \pm 9.6\%$ ) and HC ( $-6.5 \pm 8.6\%$ ) volunteers. LDL/HDL ratio also showed significant variations ( $P=0.027$ ) when initial (pre-treatment) and final (post-treatment) values were compared after OPO and HOSO intake. A moderate decrease was observed in TC after OPO consumption ( $-1.4 \pm 7.4\%$  in NC and  $-0.2 \pm 6.9\%$  in HC), whilst an increase was observed after HOSO intake in both groups ( $3.48 \pm 1.53\%$  in NC and  $2.17 \pm 2.03\%$  in HC), although these changes did not reach the level of significance ( $P=0.064$ ) due to the great interindividual variability. Comparison on the response of these biomarkers in NC and HC volunteers after consuming OPO and HOSO is shown in Supplementary Fig. 2S. The rest of the biomarkers analysed were not affected.

### Blood pressure

As shown in Table 4, SBP and DBP showed no significant changes after dietary intervention with OPO and HOSO in both population groups studied. According to the American Heart Association, all volunteers maintained normal values of DBP and SBP (< 80 mmHg and < 120 mmHg, respectively).

**Table 2** Energy intake and dietary components during the intervention trial with olive pomace oil (OPO) and high oleic sunflower oil (HOSO)

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 34				Hypercholesterolemic <i>n</i> = 30				<i>P</i> value
	OPO		HOSO		OPO		HOSO		
	Baseline	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	
Energy (kcal/day)	2168 ± 584	2076 ± 571	2198 ± 484	2086 ± 92	2120 ± 340	2123 ± 482	2261 ± 520	2084 ± 851	0.158
Proteins (g/day)	93 ± 23	91 ± 29	96 ± 23	91 ± 5	94 ± 22	99 ± 27	98 ± 22	89 ± 27	0.291
Carbohydrates (g/day)	204 ± 58	197 ± 70	209 ± 58	204 ± 10	207 ± 49	207 ± 60	214 ± 66	212 ± 88	0.891
Lipids (g/day)	100 ± 35	94 ± 35	100 ± 29	92 ± 5	91 ± 16	90 ± 33	102 ± 33	88 ± 33	0.209
SFA (g/day)	33 ± 12 <sup>a</sup>	26 ± 12 <sup>b</sup>	29 ± 12 <sup>ab</sup>	27 ± 2 <sup>ab</sup>	29 ± 5 <sup>a</sup>	27 ± 11 <sup>ab</sup>	30 ± 11 <sup>ab</sup>	24 ± 11 <sup>ab</sup>	0.036
MUFA (g/day)	45 ± 17 <sup>a</sup>	28 ± 12 <sup>b</sup>	31 ± 12 <sup>b</sup>	46 ± 3 <sup>a</sup>	41 ± 11 <sup>a</sup>	43 ± 16 <sup>a</sup>	32 ± 11 <sup>b</sup>	46 ± 22 <sup>a</sup>	<0.001
PUFA (g/day)	14 ± 6 <sup>a</sup>	28 ± 12 <sup>b</sup>	30 ± 12 <sup>b</sup>	11 ± 1 <sup>b</sup>	13 ± 5 <sup>a</sup>	12 ± 5 <sup>a</sup>	31 ± 16 <sup>b</sup>	10 ± 5 <sup>a</sup>	<0.001
Cholesterol (mg/day)	328 ± 134	331 ± 152	365 ± 152	335 ± 41	339 ± 153	382 ± 208	334 ± 137	307 ± 159	0.131
Dietary fibre (g/day)	23 ± 12	22 ± 6	23 ± 6	22 ± 1	25 ± 11	25 ± 11	28 ± 11	23 ± 11	0.064
Vitamin E (mg/day)	9 ± 6 <sup>a</sup>	24 ± 12 <sup>b</sup>	26 ± 6 <sup>b</sup>	17 ± 1 <sup>c</sup>	10 ± 5 <sup>a</sup>	21 ± 5 <sup>c</sup>	27 ± 16 <sup>b</sup>	19 ± 5 <sup>c</sup>	<0.001

Values represent mean ± SD. Data were analysed using a general linear repeated measures model. According to the Bonferroni test, superscripts correspond to significant differences within the NC or HC group. *P* values correspond to the effect of taking OPO or HOSO. Significance level was *P* < 0.05. *SFA* saturated fatty acid, *MUFA* monounsaturated fatty acid, *PUFA* polyunsaturated fatty acid

<sup>2</sup>Oil (baseline vs OPO vs HOSO)

**Table 3** Effect of olive pomace oil (OPO) and high oleic sunflower oil (HOSO) consumption on lipid profile and liver function

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 34		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 30		<i>P</i> value		
	OPO	HOSO	OPO	HOSO	Oil	N/H	N/H*Oil
Total-cholesterol (mg/dL)							
Initial	172±119	164±125	225±146	221±158			
Relative changes from initial (%)	-1.4±7.4	3.4±8.9	-0.2±6.9	2.2±11.1	0.064	0.842	0.354
Triglycerides (mg/dL)							
Initial	79±196	72±148	90±229	101±319			
Relative changes from initial (%)	-0.5±23.4	10.4±35.3	8.3±22.7	4.5±38.5	0.968	0.785	0.130
HDL-cholesterol (mg/dL)							
Initial	59±73	58±58	61±84	61±82			
Relative changes from initial (%)	1.9±10.7	2.3±10.6	4.1±12.3	3.3±11.7	0.859	0.409	0.632
LDL-cholesterol (mg/dL)							
Initial	97±110	94±113	146±167	140±183			
Relative changes from initial (%)	-2.7±12.9	4.2±12.9	-4.3±11.1	4.2±19.3	0.003	0.688	0.803
VLDL-cholesterol (mg/dL)							
Initial	18±101	14±30	18±46	20±63			
Relative changes from initial (%)	-4.4±26.9	5.5±28.1	6.7±32.0	-3.0±31.3	0.984	0.775	0.058
Apo A1 (mg/dL)							
Initial	153±150	146±102	155±115	157±129			
Relative changes from initial (%)	-1.8±7.8	1.9±9.2	2.2±9.6	1.9±9.1	0.632	0.312	0.089
Apo B (mg/dL)							
Initial	78±77	76±84	112±115	109±120			
Relative changes from initial (%)	-2.9±9.6	0.7±9.1	-6.5±8.6	-0.5±13.4	0.022	0.192	0.649
Apo B/Apo A1 (mg/dL)							
Initial	0.5±0.7	0.5±0.7	0.7±1.1	0.7±1.2			
Relative changes from initial (%)	-1.2±14.3	-2.5±15.3	-8.5±8.7	-0.5±13.4	0.318	0.210	0.130
LDL/HDL							
Initial	2±3	2±3	3±6	2±6			
Relative changes from initial (%)	-3.7±15.4	3.0±16.3	-6.2±15.1	1.7±20.2	0.027	0.473	0.837
TC/HDL							
Initial	3±4	3±4	4±7	4±6			
Relative changes from initial (%)	-3.1±11.9	1.8±9.7	-3.1±11.2	0.5±11.3	0.098	0.437	0.502
ALAT (UI/L)							
Initial	23±10	21±9	29±13	27±15			
Relative changes from initial (%)	116.8±43.5	121.2±67.7	122.3±141	114.6±36.6	0.739	0.466	0.739
ASAT (UI/L)							
Initial	24±8	23±6	26±9	26±8			
Relative changes from initial (%)	107.2±28.3	110.1±67.3	118.0±71.2	106.0±20.9	0.947	0.838	0.523

Values represent the initial (pre-treatment) mean values and relative changes from initial values expressed as percentage±SD. Relative changes from initial values were calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and analysed using a linear mixed model. *P* values in the first column correspond to the effect of taking OPO or HOSO, those of the penultimate column to the effect of the group (NC or HC), and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was *P*<0.05. *Apo* apolipoprotein, *ALAT* alanine aminotransferase, *ASAT* aspartate aminotransferase

### Biomarkers of endothelial function

Endothelial molecules E-selectin, P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 did not show significant changes (*P*>0.05) due to product effect (OPO and HOSO) (Table 5). However, an apparent tendency to decrease in E-selectin levels

after OPO (-2.6±74.1% in NC; -9.0±52.4% in HC) and HOSO (-32.7±66.3% in NC; -2.0±92.2% in HC) intake was observed (*P*=0.347). Circulating eNOS increased in both groups, particularly after OPO intervention in healthy subjects (58.0±150.8%), although these changes were not statistically significant. Finally, PAT

**Table 4** Effect of olive pomace oil (OPO) and high oleic sunflower oil (HOSO) consumption on blood pressure<sup>1</sup>

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 34		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 30		<i>P</i> value		
	OPO	HOSO	OPO	HOSO	Oil	N/H	N/H* Oil
Systolic BP (mmHg)							
Initial	113 ± 60	117 ± 57	116 ± 68	118 ± 61			
Relative changes from initial (%)	0.1 ± 4.6	- 0.2 ± 4.6	- 2.0 ± 6.8	- 0.4 ± 7.5	0.288	0.573	0.383
Diastolic BP (mmHg)							
Initial	74 ± 46	76 ± 46	78 ± 53	77 ± 55			
Relative changes from initial (%)	2.1 ± 8.6	0.8 ± 8.7	- 1.0 ± 9.0	3.3 ± 10.2	0.730	0.363	0.098

<sup>1</sup> Values represent the initial (pre-treatment) mean values and relative changes from initial values expressed as percentage ± SD. Relative changes from initial values were calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and analysed using a linear mixed model. *P* values in the first column correspond to the effect of taking OPO or HOSO, those of the penultimate column to the effect of the group (NC or HC), and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was *P* < 0.05. *BP* blood pressure

**Table 5** Effect of olive pomace oil (OPO) and high oleic sunflower oil (HOSO) consumption on biomarkers endothelial function

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 34		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 30		<i>P</i> value		
	OPO	HOSO	OPO	HOSO	Oil	N/H	N/H* Oil
eNOS (ng/mL)							
Initial	0.3 ± 2.3	0.5 ± 5.8	0.5 ± 5.5	0.6 ± 5.5			
Relative changes from initial (%)	58.0 ± 150.8	10.0 ± 138.2	38.7 ± 134.3	37.5 ± 92.3	0.827	0.493	0.070
E-selectin (ng/mL)							
Initial	6.3 ± 9.3	6.2 ± 7.6	7.3 ± 7.1	6.8 ± 6.6			
Relative changes from initial (%)	- 2.6 ± 74.1	- 32.7 ± 66.3	- 9.0 ± 52.4	- 2.0 ± 92.2	0.347	0.378	0.157
P-selectin (ng/mL)							
Initial	103 ± 59	95 ± 49	116 ± 57	107 ± 63			
Relative changes from initial (%)	18.3 ± 59.0	20.6 ± 65.3	11.4 ± 47.8	22.0 ± 61.4	0.863	0.588	0.993
ICAM-1 (ng/mL)							
Initial	1512 ± 365	1483 ± 379	1545 ± 603	1630 ± 564			
Relative changes from initial (%)	- 1.5 ± 25.9	2.1 ± 21.2	7.3 ± 56.6	- 1.2 ± 37.9	0.609	0.552	0.189
VCAM-1 (ng/mL)							
Initial	7098 ± 2917	6762 ± 3388	6299 ± 3139	6472 ± 3195			
Relative changes from initial (%)	3.6 ± 33.7	6.75 ± 40.0	15.7 ± 61.3	0.3 ± 54.1	0.480	0.753	0.277
PAT (LnRHI) <sup>2</sup>							
Initial	-	-	0.6 ± 1.4	0.5 ± 1.3			
Relative changes from initial (%)	-	-	29.5 ± 64.1	20.8 ± 49.9	0.484		-

Values represent the initial (pre-treatment) mean values and relative changes from initial values expressed as percentage ± SD. Relative changes from initial values were calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and analysed using a linear mixed model. *P* values in the first column correspond to the effect of taking OPO or HOSO, those of the penultimate column correspond to the effect of the group (NC or HC), and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *P* < 0.05. *eNOS* endothelial nitric oxide synthase, *E-selectin* endothelial selectin, *P-selectin* platelet selectin, *ICAM-1* intercellular adhesion molecule 1, *VCAM-1* vascular cell adhesion molecule 1

<sup>2</sup> PAT: peripheral arterial tonometry

determined in HC subjects did not differ in any treatment ( $P > 0.05$ ).

### Inflammatory biomarkers

According to the linear mixed model, inflammatory biomarkers did not show significant changes due to OPO and HOSO intervention (Table 6). However, when the relative changes from initial values were compared between NC and HC groups, IL-7 ( $P = 0.014$ ) and IL-12 ( $P = 0.027$ ) showed significant differences.

### Discussion

Most of the evidence on the potential health beneficial effects of olive minor components come from in vitro studies in different cell models or from preclinical animal studies [reviewed in 6]. However, clinical studies in humans on the cardiometabolic effects of these compounds are scarce, limited to the use of pure components such as squalene or triterpenic acids as drug therapy or dietary supplements [11, 12, 22]. More recently, some intervention studies assessed the effect of VOO enriched in triterpenes in healthy adults [13] or a blend of virgin and refined olive oils enriched with OA in prediabetic individuals [14]. But the effect of consuming OPO has only been addressed in postprandial studies, showing that OPO intake resulted in triglyceride-rich lipoproteins (TRL) with higher particle size than after the intake of ROO and facilitated TG clearance from TRL [23, 24]. Nevertheless, the effects on health of consuming OPO in the diet are still unknown. Here we report results from the first human intervention study with OPO, carried out in healthy individuals as well as in hypercholesterolemic subjects as a group at risk of suffering cardiovascular diseases.

Some of the most notable results observed were the decreased serum concentrations of LDL-C ( $P = 0.003$ ), Apo B ( $P = 0.022$ ) and LDL/HDL ratio ( $P = 0.027$ ), with a trend to decrease TC ( $P = 0.064$ ) (Table 3 and Fig. 2S). In a study carried out in hyperlipidemic patients consuming OA tablets, lower concentrations of TC, TG and LDL-C were observed after 4 weeks, although the statistical significance of this reduction was not established, nor the amount of OA administered to volunteers [11]. Indeed, pentacyclic triterpenes, secondary metabolites abundant in the unsaponifiable fraction of OPO, may have contributed to the reduction in plasma lipids observed in the present study, since they have been suggested to play a role in the treatment and management of CVD [25]. In the NUTRAOLEUM study, an optimized virgin olive oil (OVOO) enriched in phenolic compounds and a functional olive oil (FOO) enriched in both phenolic compounds and triterpenes were compared with VOO in healthy adults; none of the oils showed any

effect on TC or LDL-C after daily consumption of 30 mL for 3 weeks, and only OVOO caused a significant increase in HDL-C [13]. Trials in several animal models have also reported reductions in serum TC, TG, LDL-C or VLDL-C and/or increased HDL-C concentrations following oral administration of different doses (15–100 mg/kg/d) of MA [reviewed in 26], OA (5–25 mg/kg/d) [25–29] or high (200 mg/kg/d) but not low (50 mg/kg/d) doses of ursolic acid (UA) [30]. However, results from these animal studies cannot be extrapolated to humans, since the amounts of triterpenic acids fed to experimental animals were much higher than those consumed by the volunteers in the present study, amounting to less than 10 mg/d.

Squalene is another characteristic component of olive oils with potential cardioprotective effects. Of the three trials developed in hypercholesterolemic patients, only one reported reduced TC and LDL-C, and increased HDL-C concentrations when participants were supplemented with 869 mg/d of squalene for 20 weeks [22]. These amounts of squalene are closer to pharmacological treatments and much higher than those derived from dietary consumption of oils naturally containing squalene, such as in the present study, where the daily intake of 45 g of OPO provided around 36 mg of squalene. On the other hand, animal trials have shown that squalene might have cardioprotective effects mostly due to its antioxidant properties, modulating atheroma plaque formation in mice, although its potential hypocholesterolemic effects varied depending on the animal model and the amount of squalene fed [31].

Aliphatic alcohols are present in OPO (978 mg/g) in much higher concentrations than in HOSO (32 mg/kg). A review by Hargrove et al. [32] suggests that consumption of 5–20 mg per day of mixed C24–C34 alcohols reduced LDL-C and increased HDL-C concentrations. Considering that OPO provided about 44 mg/d of aliphatic alcohols in the present study, these compounds might have contributed to the observed reduction of LDL-C concentrations. In contrast to aliphatic alcohols, tocopherols and total sterols are found in similar concentrations in the OPO and HOSO; thus, although they might have beneficial effects on cardiovascular health, they would not be responsible for the different responses observed after consuming OPO or HOSO.

Indeed, after HOSO intervention, there was an increase in TC, LDL-C, LDL/HDL and TC/HDL in both NC and HC volunteers, contrary to that observed with OPO (Table 3). This was in accordance with results from an animal experiment using high-fat diets supplemented with EVOO, HOSO and SO, showing that TC and LDL-C increased, and HDL-C decreased in comparison with control animals, suggesting no effect of the phenolic fraction nor the MUFA-rich content of EVOO and HOSO [33].

It is important to highlight the effects observed after OPO intake on coronary event predictors such as LDL/HDL ratio

**Table 6** Effect of olive pomace oil (OPO) and high oleic sunflower oil (HOSO) consumption on inflammatory biomarkers

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 34		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 30		<i>P</i> value		
	OPO	HOSO	OPO	HOSO	Oil	N/H	N/H* Oil
CRP (mg/dL)							
Initial	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.2			
Relative changes from initial (%)	128.8 ± 4.1	39.2 ± 1.7	136.9 ± 10.4	237.0 ± 6.0	0.999	0.127	0.380
IL-1β (pg/mL)							
Initial	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.3	0.9 ± 1.1	1.0 ± 0.6			
Relative changes from initial (%)	5.1 ± 50.1	9.9 ± 39.9	3.9 ± 31.3	- 10.0 ± 31.9	0.317	0.503	0.080
IL-2 (pg/mL)							
Initial	9 ± 6	9 ± 4	9 ± 5	11 ± 5			
Relative changes from initial (%)	- 0.9 ± 36.3	2.6 ± 26.3	24.0 ± 65.5	- 7.7 ± 51.0	0.175	0.806	0.043
IL-4 (pg/mL)							
Initial	7 ± 3	8 ± 2	10 ± 5	10 ± 5			
Relative changes from initial (%)	1.6 ± 27.1	2.6 ± 22.0	2.4 ± 27.1	10.1 ± 35.9	0.226	0.610	0.662
IL-6 (pg/mL)							
Initial	5 ± 4	5 ± 4	5 ± 4	6 ± 4			
Relative changes from initial (%)	- 6.5 ± 23.0	2.3 ± 36.8	13.9 ± 59.9	1.4 ± 35.6	0.901	0.131	0.162
IL-7 (pg/mL)							
Initial	52 ± 50	54 ± 47	50 ± 44	50 ± 50			
Relative changes from initial (%)	- 0.3 ± 27.1	- 3.6 ± 21.4	9.3 ± 30.2	11.6 ± 32.1	0.745	0.014	0.828
IL-8 (pg/mL)							
Initial	14 ± 8	15 ± 6	14 ± 10	16 ± 13			
Relative changes from initial (%)	18.7 ± 59.6	1.2 ± 33.6	18.3 ± 57.6	5.6 ± 42.5	0.133	0.792	0.839
IL-10 (pg/mL)							
Initial	15 ± 10	15 ± 9	16 ± 8	17 ± 9			
Relative changes from initial (%)	- 3.1 ± 34.2	3.4 ± 23.6	3.3 ± 37.9	- 0.9 ± 32.1	0.606	0.909	0.386
IL-12 (p70) (pg/mL)							
Initial	7 ± 2	6 ± 2	13 ± 28	12 ± 18			
Relative changes from initial (%)	12.9 ± 61.5	8.7 ± 57.4	- 1.4 ± 23.1	- 12.5 ± 50.3	0.937	0.027	0.378
IL-13 (pg/mL)							
Initial	4 ± 2	4 ± 1	5.5 ± 4	5.9 ± 4			
Relative changes from initial (%)	5.3 ± 37.8	12.3 ± 48.1	21.6 ± 65.1	22.2 ± 70.4	0.858	0.320	0.959
IL-17 (pg/mL)							
Initial	21 ± 20	21 ± 14	30 ± 50	32 ± 56			
Relative changes from initial (%)	8.6 ± 31.4	- 1.9 ± 25.4	9.1 ± 45.6	12.5 ± 45.7	0.475	0.324	0.070
G-CSF (pg/mL)							
Initial	709 ± 1234	638 ± 872	838 ± 1299	852 ± 1295			
Relative changes from initial (%)	5.2 ± 42.5	5.1 ± 34.9	9.1 ± 45.8	13.7 ± 44.4	0.749	0.392	0.488
GM-CSF (pg/mL)							
Initial	4 ± 3	3 ± 2	6 ± 7	6 ± 7			
Relative changes from initial (%)	- 46.8 ± 72.2	- 9.7 ± 101.0	3.4 ± 90.4	- 30.8 ± 57.3	0.749	0.392	0.488
INFγ (pg/mL)							
Initial	6 ± 4	5 ± 2	8 ± 8	8 ± 7			
Relative changes from initial (%)	9.2 ± 78.0	19.7 ± 80.4	26.2 ± 77.7	1.6 ± 77.4	0.722	0.919	0.207
MCP-1 (pg/mL)							
Initial	52 ± 29	51 ± 24	51 ± 25	54 ± 24			
Relative changes from initial (%)	- 0.7 ± 37.5	0.6 ± 29.7	9.4 ± 33.0	1.4 ± 40.3	0.628	0.379	0.477
MIP-1β (pg/mL)							
Initial	1496 ± 769	1506 ± 828	1445 ± 646	1403 ± 679			
Relative changes from initial (%)	1.5 ± 55.4	- 2.9 ± 60.6	10.1 ± 49.0	4.8 ± 53.6	0.383	0.768	0.743

Table 6 (continued)

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 34		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 30		<i>P</i> value		
	OPO	HOSO	OPO	HOSO	Oil	N/H	N/H* Oil
TNF $\alpha$ (pg/mL)							
Initial	45 $\pm$ 49	45 $\pm$ 47	47 $\pm$ 49	48 $\pm$ 50			
Relative changes from initial (%)	1.6 $\pm$ 25.2	6.2 $\pm$ 15.8	6.6 $\pm$ 29.7	0.3 $\pm$ 23.1	0.953	0.911	0.203

Values represent the initial (pre-treatment) mean values and relative changes from initial values expressed as percentage  $\pm$  SD. Relative changes from initial values were calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and analysed using a linear mixed model. *P* values in the first column correspond to the effect of taking OPO or HOSO, those of the penultimate column to the effect of the group (NC or HC), and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was  $P < 0.05$ . *CRP* C reactive protein, *IL* interleukin, *G-CSF* granulocyte colony-stimulating factor, *GM-CSF* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *IFN $\gamma$*  interferon gamma, *MCP-1* monocyte chemoattractant protein-1, *MIP-1 $\beta$*  macrophage inflammatory protein 1 beta, *TNF $\alpha$*  tumour necrosis factor alpha

and Apo B concentrations. Apo B is considered a better predictor of cardiovascular risk than LDL-C [34]. As shown in Table 3, Apo B concentrations decreased following OPO consumption in healthy and at-risk participants. This is in line with the lower Apo B concentration in postprandial TRL after ingestion of OPO by healthy subjects compared to ROO [24].

Blood pressure showed no changes throughout the study, and SBP and DBP values remained within a normal range (Table 4). Several minor OPO components such as pentacyclic triterpenes (mainly OA), squalene or aliphatic alcohols (mainly octacosanol) have been associated with beneficial effects on blood pressure dysregulation [7, 35–37]. However, most of these assays were performed in vivo in hypertensive animals or in vitro using aorta rings isolated from hypertensive animals. In an intervention trial in patients diagnosed of metabolic syndrome, oral supplementation with 150 mg/d of UA for 12 weeks did not affect SBP or DBP [12], in line with the results obtained in the present study. On the other hand, it is considered that MUFA contribute to the prevention and maintenance of blood pressure in the general population [38]; therefore, no changes were expected in this regard, also considering that volunteers were normotensive subjects (Table 1).

Endothelial dysfunction is another key risk factor for atherosclerosis. None of the soluble molecules analysed as biomarkers of endothelial function showed significant changes, although circulating concentrations of eNOS increased after OPO and HOSO in both groups of volunteers (Table 5). Considering the role of eNOS on nitric oxide (NO) synthesis, which is a determining factor in vascular regulation due to its potent vasodilator action, the observed effect on eNOS, especially after OPO intake, might suggest a potential beneficial role of OPO on endothelial function. Previous animal studies have reported that OPO or its triterpene fraction (mainly OA) improve endothelial function in both aorta and mesenteric arteries by increasing eNOS expression [7]. Triterpenic

acids (OA, MA and UA) have been reported to suppress the expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in different cultured human endothelial cells [39–41], although none of these parameters showed variations after the intake of OPO and HOSO (Table 5).

Flow mediated dilatation (FMD) is a non-invasive measurement of vasodilation and it is considered an index of NO bioavailability [42]. Since measurement of FMD requires operator experience and skill, a similar automated technique for measuring endothelial function assessing the hyperemic response, known as peripheral arterial tonometry (PAT), was used in this trial [43]. Although peripheral endothelial function has been often evaluated (with the FMD technique) in studies with olive oil, the potential effect of OPO on this marker is so far unknown. A meta-analysis including 3106 subjects showed an increase in FMD in participants who received an olive oil-enriched diet [44], confirming the beneficial effects of MUFA and a potential contribution of olive oil phenolic compounds on FMD. However, in the present study PAT was not significantly changed (Table 5), and only a trend to increase PAT was observed. This is in line with results from a recent study in 53 subjects at moderate risk of CVD, where an increase in FMD was observed when consuming dairy products fortified with MUFA for 12 weeks [45].

Another underlying mechanism of endothelial dysfunction is inflammation. As shown in Table 6, no significant changes occurred after dietary intervention with both oils (OPO and HOSO). It should be remembered that, despite the high cholesterol concentrations in the at-risk group, the participants were otherwise healthy, without an established inflammatory state. Therefore, no major changes in inflammatory biomarkers were expected. Previous assays have shown that triterpenes characteristic of OPO (OA and MA) modulate endothelial cell inflammation and suppress the production of inflammatory mediators such as TNF $\alpha$  and nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in in vivo and in vitro assays [7, 8, 34, 39]. These trials were carried out

in lipopolysaccharide challenged endothelial cells [39] or in animal models of different pathologies such as hypertension [7] or obesity [8], involving inflammatory processes.

Overall, consumption of OPO during four weeks resulted in an improved blood lipid profile, decreasing LDL-C, Apo B and LDL/HDL both in healthy and at-risk volunteers, in contrast to the opposite effect observed with HOSO, with no significant changes in other CVD risk factors. It is important to highlight that this study intended to reproduce normal consumption patterns in which OPO was used as culinary oil, without further supplementing or enriching this oil with bioactive compounds, either phenolics, triterpenes, squalene, etc. This resulted in relatively low intakes of the minor components of olive unsaponifiable fraction, which might have compromised observing more clear responses on the different biomarkers studied.

This study has several strengths and limitations. The study was well-powered, and its randomized, controlled, crossover design can be considered as another strength. The dietary intervention had a realistic approach, since participants consumed a moderate amount of oil in accordance to Spanish recommendations. OPO was a non-supplemented oil as consumers can find in supermarkets. As for limitations, SO intake in the run-in and wash-out periods resulted in a different lipid profile (MUFA, PUFA, and SFA) intake in comparison with the test and control oils. However, the crossover design ensured that all subjects started with the same dietary conditions at the beginning of each intervention. NO could not be determined in blood samples. Volunteers were instructed to maintain their lifestyle unchanged; however, physical activity was not surveyed during the study. To assess endothelial function, PAT, a non-invasive technique similar to FMD, was used to measure the hyperemic response. This had certain limitations considering that the data generated by endoPAT have more variability in their results compared to the FMD technique [43].

In conclusion, OPO could have hypolipidemic actions in healthy consumers and in subjects with high blood cholesterol, contributing to cardiovascular disease prevention. This is the first chronic clinical intervention carried out with OPO and its results corroborate previous findings with some of the characteristic minor components of this oil. Therefore, this study contributes to consider OPO as a relevant source of fat in the diet.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00394-022-03001-y>.

**Acknowledgements** Laura Barrios is acknowledged for statistical support. We want to thank volunteers for their kind participation in this study.

**Author contributions** Project conception, study design and supervision: LB, RM, and BS; formal analysis and investigation: SGR, JGC,

BS, and RM; data analysis: SGR, JGC, MAS, and BS; writing: SGR and LB; funding acquisition: LB and RM; primary responsibility for final content: LB, BS, and RM. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature.

**Data, material and/or code availability** Data described in the manuscript may be made available upon request pending application and approval.

## Declarations

**Conflict of interest** Interprofesional del Aceite de Orujo de Oliva (ORIVA) financed the study and the predoctoral contract of SG-R. Community of Madrid partly financed the predoctoral contracts of MAS (PEJD-2018-PRE/SAL-9104) and JG-C (PEJD-2017-PRE/BIO-4225). No other conflicts of interests are declared. ORIVA had no part on the design, conductance, analysis or interpretation of results.

**Ethical approval** The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro de Majadahonda in Madrid (Spain) and by the CSIC Bioethics Subcommittee (approval ref. PI\_158-17).

**Consent to participate** Informed consent was obtained from all participants in the study.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. Salas-Salvadó J, Becerra-Tomás N, García-Gavilán JF, Bulló M, Barrubés L (2018) Mediterranean diet and cardiovascular disease prevention: What do we know? *Prog Cardiovasc Dis* 61:62–67. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.04.006>
2. Francula-Zaninovic S, Nola IA (2018) Management of measurable variable cardiovascular disease' risk factors. *Curr Cardiol Rev* 14:153–163. <https://doi.org/10.2174/1573403X14666180222102312>
3. Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R et al (2015) Benefits of the Mediterranean diet: insights from the PREDIMED study. *Prog Cardiovasc Dis* 58:50–60. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2015.04.003>
4. Marcelino G, Hiane PA, Freitas KC et al (2019) Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota. *Nutrients* 11:1826 <https://doi.org/10.3390/nu11081826>

5. Sánchez-Moral P, Ruíz-Méndez MV (2006) Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites* 57:47–55. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.21>
6. Mateos R, Sarriá B, Bravo L (2020) Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60:3506–3521. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1698005>
7. Valero-Muñoz M, Martín-Fernández B, Ballesteros S et al (2014) Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: mechanisms involved. *Mol Nutr Food Res* 58:376–383. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300256>
8. Claro-Cala CM, Quintela JC, Pérez-Montero M et al (2020) Pomace olive oil concentrated in triterpenic acids restores vascular function, glucose tolerance and obesity progression in mice. *Nutrients* 12:323. <https://doi.org/10.3390/nu12020323>
9. Carmo J, Cavalcante-Araújo P, Silva J et al (2020) Uvaol improves the functioning of fibroblasts and endothelial cells and accelerates the healing of cutaneous wounds in mice. *Molecules* 25:4982. <https://doi.org/10.3390/molecules25214982>
10. Fukumitsu S, Kinoshita T, Villareal MO et al (2017) Maslinic acid improves quality of life by alleviating joint knee pain in the elderly: results from a community-based pilot study. *J Clin Biochem Nutr* 61:67–73. <https://doi.org/10.3164/jcfn.16-119>
11. Luo HQ, Shen J, Chen CP et al (2018) Lipid-lowering effects of oleanolic acid in hyperlipidemic patients. *Chin J Nat Med* 6:339–346. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30065-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30065-7)
12. Ramirez-Rodriguez AM, Gonzalez-Ortiz M, Martinez-Abundis E, Acuña-Ortega N (2017) Effect of ursolic acid on metabolic syndrome, insulin sensitivity and inflammation. *J Med Food* 20:882–886. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0003>
13. Sánchez-Rodríguez E, Lima-Cabello E, Biel-Glesson S et al (2018) Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on metabolic syndrome and endothelial functional risk biomarkers in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* 10:626. <https://doi.org/10.3390/nu10050626>
14. Santos-Lozano JM, Rada M, Lapetra J et al (2019) Prevention of type 2 diabetes in prediabetic patients by using functional olive oil enriched in oleanolic acid: the PREDIABOLE study, a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 21:2526–2534. <https://doi.org/10.1111/dom.13838>
15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–502
16. Senior JR (2012) Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury—past, present, and future. *Clin Pharmacol Ther* 92:332–339. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.108>
17. Kuvvin JT, Patel AR, Sliney KA et al (2003) Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 146:168–174. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(03\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(03)00094-2)
18. Pérez-Camino MC, Cert R (1999) Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem* 47:1558–1562. <https://doi.org/10.1021/jf980881h>
19. Giacometti J (2001) Determination of aliphatic alcohols, squalene, alpha-tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst* 126:472–475. <https://doi.org/10.1039/b007090o>
20. Mateos R, Espartero JL, Trujillo M et al (2001) Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J Agric Food Chem* 49:2185–2192. <https://doi.org/10.1021/jf0013205>
21. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2016) Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española. *Tablas de Composición de Alimentos*. 18th. Ed: Pirámides (Grupo Anaya, SA), Madrid.
22. Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA (1990) Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: Comparison with cholestyramine treatment. *J Lipid Res* 31:1637–1643
23. Cabello-Moruno R, Perona JS, Osada J, Garcia M, Ruiz-Gutierrez V (2007) Modifications in postprandial triglyceride-rich lipoprotein composition and size after the intake of pomace olive oil. *J Am Coll Nutr* 26:24–31. <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719582>
24. Cabello-Moruno R, Martínez-Force E, Montero E, Perona JS (2014) Minor components of olive oil facilitate the triglyceride clearance from postprandial lipoproteins in a polarity-dependent manner in healthy men. *Nutr Res* 34:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.10.003>
25. Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J (2012) Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res* 56:1043–1057. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100668>
26. Lozano-Mena G, Sánchez-González M, Juan ME, Planas JM (2014) Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives. A promising nutraceutical? *Molecules* 19:11538. <https://doi.org/10.3390/molecules190811538>
27. Luo H, Liu J, Ouyang Q et al (2017) The effects of oleanolic acid on atherosclerosis in different animal models. *Acta Biochim Biophys Sin* 49:349–354. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx013>
28. Wang X, Liu R, Zhang W et al (2013) Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. *Molec Cell Endocrinol* 376:70–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.014>
29. Iskender H, Dokumacioglu E, Terim KA et al (2021) Effects of oleanolic acid on inflammation and metabolism in diabetic rats. *Biotech Histochem*: 1–8. <https://doi.org/10.1080/10520295.2021.1954691>
30. Jia Y, Kim S, Kim J et al (2015) Ursolic acid improves lipid and glucose metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hepatic autophagy. *Mol Nutr Food Res* 59:344–354. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400399>
31. Ibrahim NI, Fairus S, Zulfarina MS, Mohamed IN (2020) The efficacy of squalene in cardiovascular disease risk—a systematic review. *Nutrients* 12:414. <https://doi.org/10.3390/nu12020414>
32. Hargrove JL, Greenspan P, Hartle DK (2004) Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Exp Biol Med* 229:215–236. <https://doi.org/10.1177/153537020422900301>
33. Katsarou AI, Kaliora AC, Papalois A et al (2015) Serum lipid profile and inflammatory markers in the aorta of cholesterol-fed rats supplemented with extra virgin olive oil, sunflower oils and oil-products. *Int J Food Sci Nutr* 66:766–773. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1088936>
34. Sniderman AD, Thanassoulis G, Glavinovic T et al (2019) Apolipoprotein B particles and cardiovascular disease: a narrative review. *JAMA Cardiol* 4:1287–1295. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2019.3780>
35. Liu Y, Xu X, Bi D et al (2009) Influence of squalene feeding on plasma leptin, testosterone and blood pressure in rats. *Indian J Med Res* 129:150–153
36. Rodríguez-Rodríguez R (2015) Oleanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr Med Chem* 22:1414–1425. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141212122921>
37. Fernández-Aparicio Á, Schmidt-RioValle J, Perona JS et al (2019) Potential protective effect of oleanolic acid on the

- components of metabolic syndrome: a systematic review. *J Clin Med* 8:1294. <https://doi.org/10.3390/jcm8091294>
38. Miura K, Stamler J, Brown IJ et al (2013) Relationship of dietary monounsaturated fatty acids to blood pressure: the international study of macro/micronutrients and blood pressure. *J Hypertens* 31:1144–1150. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3283604016>
39. Lee W, Yang EJ, Ku SK, Song KS, Bae JS (2013) Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Inflammation* 36:94–102. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9523-9>
40. Lin YT, Yu YM, Chang WC et al (2016) Ursolic acid plays a protective role in obesity-induced cardiovascular diseases. *Can J Physiol Pharmacol* 94:627–633. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0407>
41. Ampofo E, Berg JJ, Menger MD, Laschke MW (2019) Maslinic acid alleviates ischemia/reperfusion-induced inflammation by downregulation of NFκB-mediated adhesion molecule expression. *Sci Rep* 9:6119. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42465-7>
42. Faulx MD, Wright AT, Hoit BD (2003) Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. *Am Heart J* 145:943–951. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(03\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(03)00097-8)
43. Allan RB, Vun SV, Spark, JI (2016) A comparison of measures of endothelial function in patients with peripheral arterial disease and age and gender matched controls. *Int J Vasc Med* 2016:2969740. <https://doi.org/10.1155/2016/2969740>
44. Schwingshackl L, Christoph M, Hoffmann G (2015) Effects of olive oil on markers of inflammation and endothelial function—a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 7:7651–7675. <https://doi.org/10.3390/nu7095356>
45. Vasilopoulou D, Markey O, Kliem KE et al (2020) Reformulation initiative for partial replacement of saturated with unsaturated fats in dairy foods attenuates the increase in LDL cholesterol and improves flow-mediated dilatation compared with conventional dairy: the randomized, controlled replacement of saturated fat in dairy on total cholesterol (RESET) study. *Am J Clin Nutr* 111:739–748. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz344>

**Supplementary Information**

**Olive pomace oil can improve blood lipid profile: a randomized, blind, crossover, controlled clinical trial in healthy and at-risk volunteers.**

*European Journal of Nutrition*

Susana González-Rámila, Beatriz Sarriá, Miguel A. Seguido, Joaquín García-Cordero, Raquel Mateos, Laura Bravo\*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC). Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid. Spain.

**Supplementary Table 1S.** Chemical composition of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO).

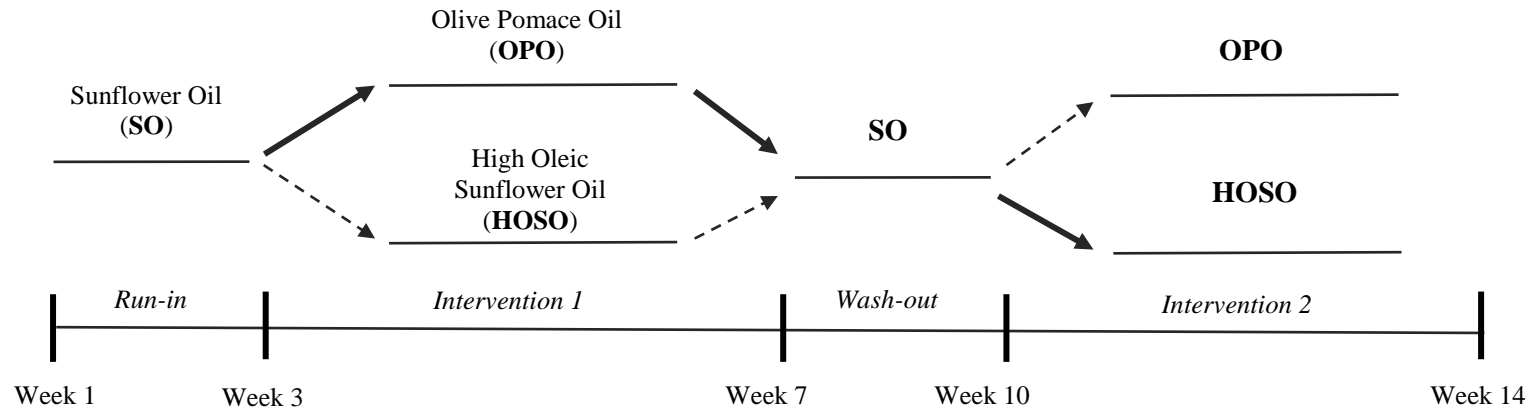
	OPO	HOSO	SO
<b>Fatty acids (%)</b>			
C 14:0 (Myristic)	0.02	0.0	0.1
C 16:0 (Palmitic)	11.63	4.2	6.4
C 16:1 (Palmitoleic)	0.98	0.1	0.2
C 17:0 (Margaric)	0.07	0.0	0.1
C 17:1 (Margaroleic)	0.11	0.1	0.1
C 18:0 (Stearic)	2.83	3.3	3.6
C 18:1 (Oleic)	71.01	76.5	29.6
C 18:2 (Linoleic)	11.5	13.9	58.6
C 20:0 (Arabic)	0.49	0.3	0.3
C 18:3 (Linolenic)	0.76	0.1	0.1
C 20:1 (Eicosenoic)	0.34	0.2	0.2
C 22:0 (Behenic)	0.19	1.0	0.7
C 24:0 (Lignoceric)	0.07	0.3	0.2
<i>Trans</i> Oleic ( <i>t</i> -C 18:1)	0.32	0.0	0.0
<i>Trans</i> Linoleic + <i>Trans</i> Linolenic ( <i>t</i> -C18:2 + <i>t</i> -C18:3)	0.1	0.2	0.4
<b>Triglycerides (%)</b>			
C 46	<0.05	<0.05	<0.05
C 48	0.14	<0.05	<0.05
C 50	4.54	1.34	0.66
C 52	32.38	19.17	12.93
C 54	61.43	77.73	83.96
C 56	1.27	0.92	1.16
C 58	0.24	0.84	1.29
C 60	<0.05	<0.05	<0.05
C 62	<0.05	<0.05	<0.05
Squalene (ppm)	799	87	117
<b>Tocopherols (mg/kg)</b>			
$\alpha$ -Tocopherol (vit E)	357	420	518
$\beta$ -Tocopherol	<2	40	44
$\gamma$ -Tocopherol	32	72	<2
$\delta$ -Tocopherol	<2	51	<2
<b>Sterols (%)</b>			
Cholesterol	0.1	0.1	0.1
Brassicasterol	<0.1	<0.1	<0.1
24-Methylcholesterol	0.2	0.2	0.3
Campesterol	3.2	8.7	8.7
Campestanol	0.1	0.1	0.1
Stigmasterol	1.2	8.4	7.8
$\Delta$ 7-Campesterol	<0.1	2.9	2.7
$\Delta$ 5,23-Estigmastadienol	0.8	0.2	0.1

Clerosterol	1.5	0.8	0.7
$\beta$ -Sitosterol	86.1	54.1	54.6
Sitostanol	1.7	0.6	0.5
$\Delta$ 5-Avenasterol	1.6	3.6	3.4
$\Delta$ 5,24-Stigmastadienol	2	1.1	1
$\Delta$ 7-Stigmastenol	0.4	13.5	14.5
$\Delta$ 7-Avenasterol	1	5.7	5.5
$\beta$ -Sitosterol apparent	93.8	60.5	60.3
Total Sterols (ppm)	2839	3040	3315
<b>Triterpenic alcohols (mg/kg)</b>			
Erythrodiol + Uvaol	886.6	<1.0	<1.0
<b>Phenols (mg/kg)</b>			
Total phenols	< 1.0	< 1.0	< 1.0
<b>Triterpenic acids (mg/kg)</b>			
Oleanolic acid	187.3	<2.0	<2.0
Ursolic acid	6.9	<2.0	<2.0
Maslinic acid	2.3	<2.0	<2.0
<b>Aliphatic alcohols (mg/kg)</b>			
C22+C24+C26+C28	978	32	26

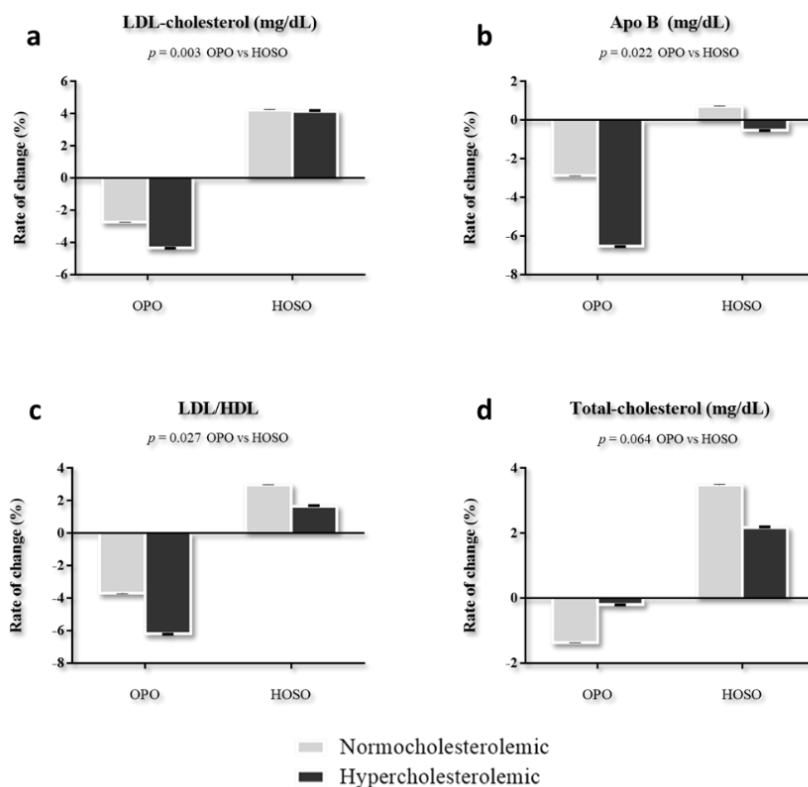
### Chemical characterization of the study oils

The oils used in the study were analyzed according to the following standardized methods: ISO 12228-2:2014 method for the determination of sterols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex V for determining triterpenic alcohols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex XIX for determining aliphatic alcohols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex X for determining fatty acid composition; and ISO 9936:2016 for determining tocopherols and tocotrienols. Triterpenic acids were analyzed following the method of Pérez-Camino & Cert (1999) (1), and squalene was determined by gas chromatography (Giacometti, 2001) (2). Phenols were analyzed by high-performance liquid chromatography with on-line diode array detection (HPLC-DAD) according to the procedure by Mateos et al. (2001) (3).

1. Pérez-Camino MC, Cert A (1999) Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem* 47:1558-1562.
2. Giacometti J (2001) Determination of aliphatic alcohols, squalene, alpha-tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst* 126:472-475.
3. Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León-Camacho M, Alcudia F, Cert A (2001) Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J Agric Food Chem* 49:2185-2192.



**Supplementary Figure 1S** Timeline of the nutritional intervention with olive pomace oil (OPO), high-oleic acid sunflower oil (HOSO). Normal sunflower oil (SO) was used during run-in and wash-out.



**Supplementary Figure 2S** Values represent mean  $\pm$  SEM of (a) LDL-cholesterol, (b) Apolipoprotein B, (c) LDL/HDL and (d) Total-cholesterol. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value]. Data were analyzed using a linear mixed model.  $p$  values in the first column correspond to the effect of taking the oil (olive pomace oil -OPO- or high oleic sunflower oil -HOSO-).

### 1.3. Resultados no publicados

1.3.1. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en biomarcadores de diabetes, obesidad y parámetros antropométricos.

Para evaluar los efectos del consumo de AOO y AGAO sobre parámetros asociados con la resistencia a la insulina y la DM2, se determinaron los valores de glucosa, insulina y HbA1c, tres parámetros bioquímicos empleados comúnmente en la práctica clínica para la detección de la DM2. Según se observa en la Tabla 1, las concentraciones de glucosa y HbA1c en sangre no mostraron variaciones significativas tras el consumo de AOO y AGAO. Además, según indican los valores medios iniciales (pretratamiento) y finales (postratamiento) mostrados en la Tabla 1, todos los valores se encontraron dentro de los rangos normales para la población adulta sana, 70-100 mg/dL en el caso de la glucosa en ayunas y <6,5 % para HbA1c (Federación Española de Diabetes, FEDE). En lo que respecta a la insulina, si bien no hubo variaciones por efecto del aceite (AOO y AGAO), sí que se observaron cambios estadísticamente significativos por pertenecer al grupo de sujetos sanos o de riesgo ( $p=0,004$ ), con una tendencia al alza más marcada en los hipercolesterolémicos (Tabla 1).

Por lo tanto, puesto que los voluntarios no eran diabéticos en ninguno de los grupos (normocolesterolémicos e hipercolesterolémicos), el hecho de no observar cambios en la glucemia e insulina en ayunas, así como en el porcentaje de HbA1c tras la intervención con ambos tipos de aceite estuvo dentro de lo esperado.

Se sabe que el AOO puede ejercer efectos beneficiosos en la modulación de la glucemia, mejorando la tolerancia a la glucosa y reduciendo la resistencia a la insulina. Así se evidenció en un reciente estudio desarrollado en ratones obesos tras la administración oral de AOO enriquecido en ácidos oleanólico y maslínico, que observó una mejora significativa de la tolerancia a la glucosa y una reducción del área bajo la curva de la glucosa en comparación con las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (Claro-Cala y cols., 2020). Asimismo, otro ensayo desarrollado en sujetos prediabéticos también relacionó el consumo de aceite de oliva enriquecido con ácido oleanólico con un menor riesgo de desarrollar diabetes, promoviendo el uso de este ácido triterpénico como nuevo ingrediente funcional y/o fármaco para la prevención de la DM2 en personas con riesgo de desarrollarla (Santos-Lozano y cols., 2019). Por lo tanto, y en vista de lo

observado en estos estudios, sería de gran interés realizar ensayos clínicos en voluntarios hiperglucémicos empleando AOO en la dieta, dado su alto contenido de manera natural en compuestos triterpénicos.

Por otro lado, el efecto del AGAO sobre las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa ha sido evaluado en distintos ensayos clínicos desarrollados en sujetos sanos, comparando este aceite con suplementos de ácido linoleico conjugado (Lambert y cols., 2007) y con la administración oral de ácidos grasos de cadena media (Tholstrup y cols., 2004). En este último ensayo se evidenció una concentración de glucosa plasmática significativamente menor en aquellos participantes que reemplazaron su ingesta habitual de grasas por 70 gramos de AGAO (Tholstrup y cols., 2004). No obstante, estos resultados no serían extrapolables a los obtenidos en la presente Tesis Doctoral, dado que se compararon dos fuentes grasas preferentemente monoinsaturadas (AOO y AGAO), y que la ingesta diaria administrada (45 g/día) no coincide con las dosis empleadas en los estudios citados.

Tabla 1. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol alto oleico (AGAO) en la glicemia, la insulinemia, la concentración de hemoglobina glicosilada (HbA1c), los índices de resistencia/sensibilidad a la insulina (HOMA-IR/QUICKI) y en la función de células beta pancreáticas (HOMA-B).

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>Glucosa (mg/dL)</b>							
Inicial	79 ± 1	79 ± 1	81 ± 2	81 ± 2	-	-	-
Final	78 ± 1	80 ± 1	81 ± 2	81 ± 2	-	-	-
Tasa de cambio	-0,5 ± 1,5	0,9 ± 1,6	0,6 ± 1,9	0,8 ± 1,8	0,693	0,672	0,732
<b>HbA1c (%)</b>							
Inicial	5,47 ± 0,04	5,53 ± 0,04	5,49 ± 0,04	5,48 ± 0,04	-	-	-
Final	5,45 ± 0,01	5,41 ± 0,01	5,49 ± 0,03	5,46 ± 0,04	-	-	-
Tasa de cambio	-2,0 ± 1,8	2,8 ± 3,9	0,0 ± 0,4	-0,3 ± 0,6	0,306	0,558	0,266

Continuación Tabla 1.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>Insulina (μUI/mL)</b>							
Inicial	7,9 ± 0,7	6,9 ± 0,5	7,4 ± 0,7	7,3 ± 0,7	-	-	-
Final	6,6 ± 0,6	7,6 ± 0,6	7,2 ± 0,6	8,0 ± 0,8	-	-	-
Tasa de cambio	-13,3 ± 5,5	12,7 ± 4,9	7,8 ± 8,4	21,3 ± 9,7	0,173	0,004	0,666
<b>HOMA-IR</b>							
Inicial	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	-	-	-
Final	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2	-	-	-
Tasa de cambio	-13,4 ± 5,7	13,9 ± 5,3	10,7 ± 10,2	20,9 ± 9,5	0,015	0,081	0,241
<b>HOMA-β</b>							
Inicial	286 ± 38	203 ± 36	161 ± 16	196 ± 38	-	-	-
Final	368 ± 47	260 ± 62	187 ± 33	203 ± 31	-	-	-
Tasa de cambio	18,4 ± 18,7	40,6 ± 26,1	27,9 ± 21,5	41,1 ± 24,8	0,287	0,509	0,822
<b>QUICKI</b>							
Inicial	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01	-	-	-
Final	0,38 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01	-	-	-
Tasa de cambio	3,8 ± 1,22	-1,92 ± 0,90	0,47 ± 1,45	-1,90 ± 1,20	0,001	0,153	0,162

Los valores representan la media ± SEM. La tabla muestra los valores medios iniciales (pretratamiento) y finales (postratamiento). La tasa de cambio se calculó a partir de los valores iniciales y finales como [(valor final-valor inicial)/valor inicial] y se expresó como porcentaje. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal mixto. Los valores *p* de la primera columna corresponden al efecto de tomar el aceite (aceite de orujo de oliva -AOO- o aceite de girasol alto oleico -AGAO-), los de la penúltima columna al efecto del grupo [normocolesterolémico (N) o hipercolesterolémico (H)], y la última columna a la interacción del aceite y el grupo. El nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$ . HbA1c: hemoglobina glicosilada; HOMA-IR: modelo homeostático para valorar la resistencia a la insulina; HOMA-β: modelo homeostático para valorar la funcionalidad de las células β pancreáticas; QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index.

El modelo homeostático propuesto por Matthews y cols. (1985) aplicado para evaluar la resistencia a la insulina, HOMA-IR, mostró valores positivos y estadísticamente significativos ( $p=0,015$ ) por efecto del producto (AOO y AGAO) (Tabla 1). Tras la ingesta a dosis nutricionales de AOO, el valor medio de HOMA-IR disminuyó en el grupo normocolesterolémico (tasa de cambio  $-13,4 \pm 5,7$ ) y aumentó en el grupo

hipercolesterolémico ( $13,9 \pm 5,3$ ). Sin embargo, los valores medios de este parámetro incrementaron en ambos grupos tras el consumo de AGAO (Tabla 1). El otro modelo de evaluación de la homeostasis que permite conocer la actividad de las células beta pancreáticas, HOMA- $\beta$ , no mostró cambios significativos. En cambio, el índice calculado para conocer la sensibilidad a la insulina, QUICKI, mostró variaciones significativas por el efecto del producto ( $p=0,001$ ) tras el consumo de AOO y AGAO. Según se puede observar en la Tabla 1, tras la ingesta de AGAO en ambos grupos de estudio disminuyó este marcador. No sucedió lo mismo tras la intervención con el AOO, mostrando un aumento en el grupo de sujetos sanos mientras que se mantuvo estable en el grupo hipercolesterolémico. Tratándose de un índice que informa sobre la sensibilidad a la insulina, el incremento inducido por el AOO en sujetos sanos se consideró un efecto favorable. Por todo ello, se puede afirmar que el consumo a dosis nutricionales de AOO durante cuatro semanas mostró una respuesta satisfactoria en los marcadores empleados para evaluar la resistencia (HOMA-IR) y la sensibilidad (índice QUICKI) a la insulina en sujetos sanos. Además, a pesar de no alcanzar el nivel de significancia (establecido en  $p<0,05$ ), estos resultados se vieron acompañados por una tendencia descendente en las concentraciones séricas de glucosa, Hb1Ac e insulina en el grupo normocolesterolémico. Ahora bien, si se tiene en cuenta que los efectos beneficiosos fueron observados en una población no diabética, dichos resultados deberían tratarse con cierta cautela, pues en todos los casos los biomarcadores de diabetes se mantuvieron dentro del rango de normalidad. No obstante, sí pone de manifiesto el interés de nuevos estudios de intervención en sujetos con resistencia a la insulina o prediabetes, a fin de evaluar el potencial efecto preventivo del AOO ante el desarrollo de DM2.

Para conocer más en profundidad el comportamiento del AOO y AGAO sobre la patogenia de la diabetes y la obesidad se analizaron otros parámetros complementarios, como fueron las concentraciones de insulina, péptido C, glucagón, las incretinas GIP y GLP-1, y las adipoquinas PAI-1, resistina y visfatina (Tabla 2). Cabe señalar que la medición de la insulina determinada por el método Múltiplex se expresó en pg/mL (Tabla 2), mientras que los valores de esta hormona recogidos en la Tabla 1 corresponden a Unidades Internacionales ( $\mu$ UI) /mL de suero, lo que explica las diferencias en los valores reportados. Como se puede observar en la Tabla 2, los valores de insulina estaban al borde de la significación estadística ( $p=0,049$ ) por efecto del grupo, con un mayor incremento en los participantes hipercolesterolémicos. Se sabe que la producción elevada de insulina

por el páncreas puede ser un indicio prematuro de resistencia a la insulina que, pasado el tiempo, puede llegar a manifestarse como DM2. Por ello, los mayores niveles de resistencia a la insulina observados en el grupo de sujetos de riesgo, sumado a la presencia de niveles altos de colesterol en sangre en estos voluntarios, puede jugar un papel negativo en el riesgo a desarrollar trastornos cardiometabólicos como DM2 o síndrome metabólico (Xi y cols., 2020a).

Otro parámetro estrechamente relacionado con la biosíntesis de la insulina, el péptido C, mostró variaciones estadísticamente significativas ( $p=0,012$ ) por efecto de la intervención dietética (AOO y AGAO). Así, tras el consumo de AOO se produjo un descenso en los niveles de péptido C en el grupo sano (tasa de cambio  $-4,7 \pm 4,1$ ), y un aumento en el grupo hipercolesterolémico ( $9,2 \pm 6,9$ ). No sucedió lo mismo tras la intervención dietética con el AGAO, que mostró una tendencia ascendente en ambos grupos de población (normocolesterolémicos:  $6,6 \pm 4,1$ ; hipercolesterolémicos:  $14,2 \pm 5,1$ ). A pesar de que el péptido C es metabólicamente inactivo (es decir, no ejerce ninguna función fisiológica *per se*), es el mejor indicador para valorar la función  $\beta$  pancreática (capacidad de secreción de la insulina). La insulina se produce en la célula  $\beta$  a partir del procesado enzimático de la proinsulina, que da lugar a la forma activa de la insulina y al péptido C, el cual se produce en una proporción equimolar a la insulina. A partir de los valores de péptido C se puede conocer la cantidad de insulina endógena que produce el páncreas, por lo que en la práctica clínica este parámetro se emplea comúnmente para distinguir la DM1 y la DM2 (Pineda, 2015). Valores anormalmente bajos de péptido C ( $<0,5$  ng/mL) son indicativos de una producción insuficiente de insulina por el páncreas, como ocurre en DM1, mientras que, en situaciones de resistencia a la insulina, como la DM2 u obesidad, las concentraciones de péptido C pueden superar los valores normales ( $0,5 - 2$  ng/mL) debido a la mayor síntesis y secreción de insulina para compensar la situación de resistencia a la insulina (Leighton y cols., 2017). A pesar de las diferencias observadas en nuestro estudio, en todos los casos los voluntarios mostraron valores de péptido C dentro del rango de normalidad, lo que está de acuerdo con el hecho de que eran sujetos sanos o moderadamente hipercolesterolémicos, pero no diabéticos ni tenían obesidad o síndrome metabólico. Alguno de los ácidos triterpénicos presentes en el AOO, como el ácido ursólico, ha sido evaluado en modelos murinos diabéticos, demostrando que una dieta rica en grasas suplementada con ácido ursólico ( $0,5$  g/kg de la dieta) produce un aumento significativo en la concentración plasmática del péptido C (Jang y

cols., 2009). Este aumento estaría en línea con lo observado en el grupo de riesgo (tasa de cambio  $2,9 \pm 5,3$ ) tras la intervención dietética con el AOO. Sin embargo, como sucede con otros ensayos donde se evalúa una dieta suplementada con un componente en concreto, en este caso el ácido ursólico, la cantidad administrada (0,5 g/kg de la dieta) supera considerablemente la aportada por los 45 gramos diarios (aproximadamente 0,3 mg/d de ácido ursólico) en el presente ensayo.

Tabla 2. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol alto oleico (AGAO) en biomarcadores de diabetes y obesidad.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>Insulina (pg/mL)</b>							
Inicial	160 ± 11	145 ± 9	161 ± 14	171 ± 14	-	-	-
Final	144 ± 12	146 ± 12	167 ± 14	183 ± 14	-	-	-
Tasa de cambio	-8,5 ± 4,0	1,0 ± 5,2	9,2 ± 6,9	14,6 ± 6,3	0,365	0,049	0,587
<b>Péptido C (pg/mL)</b>							
Inicial	970 ± 65	914 ± 60	1020 ± 73	1005 ± 72	-	-	-
Final	685 ± 48	827 ± 63	842 ± 76	792 ± 68	-	-	-
Tasa de cambio	-4,7 ± 4,1	6,6 ± 4,1	2,9 ± 5,3	14,2 ± 5,1	0,012	0,062	0,847
<b>Glucagón (pg/mL)</b>							
Inicial	2107 ± 85	2091 ± 99	2179 ± 95	2197 ± 99	-	-	-
Final	2094 ± 94	1991 ± 91	2134 ± 89	2228 ± 118	-	-	-
Tasa de cambio	0,1 ± 3,0	-3,1 ± 2,8	-0,7 ± 2,9	2,1 ± 2,5	0,906	0,454	0,294
<b>GIP (pg/mL)</b>							
Inicial	70 ± 6	82 ± 7	85 ± 8	103 ± 19	-	-	-
Final	85 ± 15	75 ± 9	98 ± 17	94 ± 11	-	-	-
Tasa de cambio	25,5 ± 14,1	9,4 ± 11,8	18,9 ± 13,6	16,1 ± 11,5	0,455	0,997	0,676

Continuación Tabla 2.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>GLP-1 (pg/mL)</b>							
Inicial	154 ± 7	157 ± 8	160 ± 6	167 ± 8	-	-	-
Final	158 ± 8	151 ± 9	166 ± 5	171 ± 9	-	-	-
Tasa de cambio	5,8 ± 5,0	-3,5 ± 3,5	4,4 ± 4,9	2,3 ± 6,2	0,203	0,676	0,784
<b>PAI-1 (pg/mL)</b>							
Inicial	3598 ± 244	3659 ± 345	4542 ± 396	4705 ± 394	-	-	-
Final	3571 ± 327	3766 ± 439	4743 ± 496	4594 ± 456	-	-	-
Tasa de cambio	-5,2 ± 8,0	2,4 ± 8,6	-7,0 ± 10,4	-1,9 ± 6,1	0,212	0,487	0,445
<b>Resistina (pg/mL)</b>							
Inicial	4727 ± 365	4811 ± 361	3784 ± 298	4161 ± 368	-	-	-
Final	5064 ± 341	5174 ± 852	4357 ± 283	4253 ± 304	-	-	-
Tasa de cambio	14,3 ± 6,8	3,5 ± 6,3	23,2 ± 8,7	7,7 ± 6,7	0,050	0,372	0,643
<b>Leptina (pg/mL)</b>							
Inicial	2422 ± 403	2559 ± 421	2480 ± 358	2624 ± 389	-	-	-
Final	2437 ± 412	2588 ± 519	2490 ± 372	2653 ± 343	-	-	-
Tasa de cambio	7,1 ± 7,1	6,3 ± 5,6	4,6 ± 8,6	7,7 ± 5,3	0,807	0,029	0,708
<b>Grelina (pg/mL)</b>							
Inicial	378 ± 25	371 ± 25	380 ± 33	394 ± 30	-	-	-
Final	361 ± 24	338 ± 24	374 ± 36	382 ± 31	-	-	-
Tasa de cambio	0,0 ± 5,0	-8,5 ± 3,5	0,0 ± 5,0	-1,3 ± 4,7	0,285	0,416	0,514
<b>Visfatina (pg/mL)</b>							
Inicial	3502 ± 196	3730 ± 244	3648 ± 186	3821 ± 160	-	-	-
Final	3596 ± 190	3323 ± 236	3958 ± 159	3747 ± 258	-	-	-
Tasa de cambio	11,2 ± 7,6	-8,1 ± 5,1	15,8 ± 8,5	-1,9 ± 4,9	0,003	0,462	0,982

Continuación Tabla 2.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>Adiponectina (ng/mL)</b>							
Inicial	61 ± 15	38 ± 10	47 ± 12	71 ± 18	-	-	-
Final	47 ± 12	48 ± 13	52 ± 14	72 ± 18	-	-	-
Tasa de cambio	-8,6 ± 5,4	24,1 ± 10,4	4,4 ± 3,9	24,1 ± 10,4	0,543	0,876	0,232
<b>Adipsina (pg/mL)</b>							
Inicial	641 ± 51	650 ± 50	664 ± 55	700 ± 52	-	-	-
Final	677 ± 58	656 ± 55	670 ± 60	725 ± 63	-	-	-
Tasa de cambio	6,0 ± 3,9	2,7 ± 4,5	3,5 ± 5,3	1,4 ± 3,6	0,451	0,172	0,142

Los valores representan la media ± SEM. La tabla muestra los valores medios iniciales (pretratamiento) y finales (postratamiento). La tasa de cambio se calculó a partir de los valores iniciales y finales como [(valor final-valor inicial)/valor inicial] y se expresó como porcentaje. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal mixto. Los valores *p* de la primera columna corresponden al efecto de tomar el aceite (aceite de orujo de oliva -AOO- o aceite de girasol alto oleico -AGAO-), los de la penúltima columna al efecto del grupo [normocolesterolémico (N) o hipercolesterolémico (H)], y la última columna a la interacción del aceite y el grupo. El nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$ . GIP: polipéptido inhibidor gástrico; GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1.

El glucagón es una hormona producida por las células alfa del páncreas, con efecto hiperglucemiante y, por tanto, antagonico a la insulina. Su secreción por las células alfa pancreáticas se produce en respuesta a niveles bajos de glucosa en sangre. Los niveles de esta hormona, al igual que los de las incretinas GIP y GLP-1, no se vieron modificados tras la intervención con los dos tipos de aceites en ambos grupos de voluntarios. Las incretinas son polipéptidos secretados por células enteroendocrinas intestinales cuya producción responde a la presencia de nutrientes, en especial de glucosa, estimulando la secreción de insulina por las células beta-pancreáticas con el fin de modular la glicemia postprandial (Boer y Holst, 2020). En pacientes obesos o con DM2, la secreción de GLP-1 está reducida, mientras que la producción de GIP es menor en sujetos obesos, no viéndose afectada en la DM2 (Boer y Holst, 2020). Distintos estudios *in vitro* con células intestinales o *in vivo* en modelos animales diabéticos han mostrado que los ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico son capaces de aumentar la secreción de GLP-1, por lo que se les ha atribuido un posible efecto antidiabético (Chen y cols., 2017; Lo y cols., 2017). Ahora bien, este tipo de efecto se produce de forma postprandial, de modo que el

diseño aplicado en el presente estudio no permite comparar el posible efecto de los ácidos triterpénicos presentes en el AOO con otros estudios. Lo mismo sucede con los estudios llevados a cabo con el AGAO, cuyo efecto sobre las hormonas intestinales (GIP y GLP-1) ha sido evaluado en diversos ensayos clínicos postprandiales tomando este aceite vegetal como aceite control (Filippou y cols., 2014; Mo y cols., 2019).

Resistina, visfatina y PAI-1, al igual que adiponectina, adiposina y leptina, son adipoquinas, moléculas secretadas principalmente en el tejido adiposo, bien por los adipocitos o bien por las células inmunes presentes en dicho tejido. Niveles circulantes elevados de resistina, visfatina y PAI-1 se han asociado a obesidad, resistencia a insulina, DM2, síndrome metabólico y ECV (Recinella y cols., 2020), de ahí el interés de estudiar el efecto del AOO sobre estas adipoquinas. Según los datos reportados en la Tabla 2, ninguno de estos marcadores mostró cambios significativos tras la intervención con los dos tipos de aceite vegetal (AOO y AGAO).

Además de las adipoquinas anteriormente señaladas, leptina, adiponectina y adiposina, así como la grelina, también desempeñan un papel importante en la obesidad. Estos polipéptidos tienen una importante función reguladora del apetito y del metabolismo energético, por lo que la alteración en la producción o en la secreción de estas hormonas contribuye al desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a insulina o ECV (Recinella y cols., 2020). En la Tabla 2, se observa que el consumo de AOO y AGAO durante 4 semanas no produjo cambios estadísticamente significativos en ninguno de estos parámetros.

Se sabe que las hormonas grelina y leptina desempeñan una función importante en la regulación del hambre (grelina) y la saciedad (leptina) (Sovetkina y cols., 2020). Por este motivo se ha generado un gran interés en la investigación sobre estas hormonas como posible tratamiento frente a la obesidad (Makris y cols., 2017; Izquierdo y cols., 2019). En este sentido, diferentes ensayos *in vivo* desarrollados en modelos murinos obesos han mostrado una disminución en la síntesis de grelina al evaluar dos componentes minoritarios propios del AOO como son el ácido oleanólico (10 mg/kg) y el ácido ursólico (50 mg/L) en el agua (de Melo y cols., 2010; Rao y cols., 2011). Con relación a la leptina, los resultados reportados en la literatura son algo contradictorios; mientras que Melo y cols. (2010) y Rao y cols. (2011) observaron un aumento en los niveles plasmáticos de esta hormona en ratones tratados con ácido oleanólico y ácido ursólico, Jia y cols. (2015)

describieron una reducción de los niveles de leptina en ratones suplementados con ácido ursólico (50 y 200 mg/kg). En el presente ensayo, la cantidad de compuestos triterpénicos aportados por el AOO (~8-9 mg/día de ácido oleanólico y 0,3 mg/día de ácido ursólico) y el AGAO (< 0,3 mg/día del total de ácidos triterpénicos) fue considerablemente inferior a los administrados en los estudios citados anteriormente, lo que justificaría la ausencia de cambios significativos por efecto del producto (AOO y AGAO).

Tabla 3. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol alto oleico (AGAO) en medidas antropométricas.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H x Aceite
<b>Peso (kg)</b>							
Inicial	67 ± 2	67 ± 2	73 ± 3	73 ± 3	-	-	-
Final	67 ± 2	67 ± 2	73 ± 3	73 ± 3	-	-	-
Tasa de cambio	-0,2 ± 0,2	-0,3 ± 0,2	-0,2 ± 0,2	-0,1 ± 0,3	0,591	0,839	0,683
<b>Grasa corporal (%)</b>							
Inicial	24 ± 2	23 ± 2	25 ± 1	25 ± 1	-	-	-
Final	23 ± 2	23 ± 2	25 ± 1	24 ± 1	-	-	-
Tasa de cambio	1,1 ± 1,2	0,6 ± 1,5	-1,3 ± 1,7	4,9 ± 2,9	0,681	0,255	0,217
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>							
Inicial	24 ± 1	24 ± 1	25,2 ± 0,7	25,1 ± 0,7	-	-	-
Final	24 ± 1	24 ± 1	25,2 ± 0,7	25,1 ± 0,7	-	-	-
Tasa de cambio	0,08 ± 0,44	-0,15 ± 0,30	-0,28 ± 0,52	0,32 ± 0,24	0,911	0,659	0,288
<b>Grasa visceral (%)</b>							
Inicial	3,7 ± 0,5	3,7 ± 0,5	7,2 ± 0,7	7 ± 1	-	-	-
Final	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,5	7,1 ± 0,7	7 ± 1	-	-	-
Tasa de cambio	1,9 ± 3,6	5,0 ± 6,2%	0,9 ± 2,1	0,5 ± 2,1	0,521	0,854	0,353

Continuación Tabla 3.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H x Aceite
<b>Perímetro de Cintura (cm)</b>							
Inicial	75 ± 1	75 ± 1	83 ± 2	81 ± 3	-	-	-
Final	75 ± 1	75 ± 1	82 ± 2	82 ± 2	-	-	-
Tasa de cambio	-0,5 ± 0,8	0,8 ± 1,1	0,7 ± 1,2	-1,0 ± 0,7	0,756	0,800	0,960
<b>Perímetro de Cadera (cm)</b>							
Inicial	98 ± 1	97 ± 1	98 ± 1	98 ± 1	-	-	-
Final	98 ± 1	98 ± 1	98 ± 1	98 ± 1	-	-	-
Tasa de cambio	-0,1 ± 0,3	-0,3 ± 0,3	1,9 ± 0,8	1,3 ± 1,0	0,009	0,299	0,471

Los valores representan la media ± SEM. La tabla muestra los valores medios iniciales (pretratamiento) y finales (postratamiento). La tasa de cambio se calculó a partir de los valores iniciales y finales como [(valor final-valor inicial)/valor inicial] y se expresó como porcentaje. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal mixto. Los valores *p* de la primera columna corresponden al efecto de tomar el aceite (aceite de orujo de oliva -AOO- o aceite de girasol alto oleico -AGAO-), los de la penúltima columna al efecto del grupo [normocolesterolémico (N) o hipercolesterolémico (H)], y la última columna a la interacción del aceite y el grupo. El nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$ . IMC: índice de masa corporal.

Por último, en cada visita programada se llevaron a cabo las distintas determinaciones antropométricas señaladas en la sección de Materiales y Métodos para conocer el efecto del consumo regular de AOO y AGAO sobre el peso, perímetros corporales y composición corporal de los voluntarios (Tabla 3). De acuerdo con el modelo lineal mixto aplicado sobre las tasas de cambio, el consumo de ambos aceites vegetales (AOO y AGAO) resultó en variaciones significativas ( $p=0,009$ ) en el perímetro de cadera. A pesar de que los cambios fueron mínimos, se pudo apreciar un leve descenso del perímetro de cadera en el grupo normocolesterolémico (AOO:  $-0,1 \pm 0,3$ ; AGAO  $-0,3 \pm 0,3$ ) y un ligero aumento en el grupo de sujetos de riesgo (AOO:  $1,9 \pm 0,8$ ; AGAO  $1,3 \pm 1,0$ ) tras la ingesta regular de AOO y AGAO (Tabla 3). El resto de los parámetros evaluados no mostraron variaciones estadísticamente significativas debido al efecto del producto. Esta situación estuvo dentro de lo previsto considerando que los participantes del estudio, tal y como indican los valores medios iniciales y finales de IMC, no padecían obesidad (Tabla 3). No obstante, cabe mencionar que el efecto beneficioso sobre parámetros antropométricos ha sido observado en diversos estudios desarrollados en ratones obesos tras la administración de ácido oleanólico (de Melo y cols., 2010), ácido

ursólico (Rao y cols., 2011), o con AOO enriquecido en ácidos triterpénicos (ácido oleanólico y ácido maslínico) (Claro-Cala y cols., 2020), mostrando no sólo una disminución del peso corporal, sino también de la adiposidad visceral. Probablemente el uso de aceites naturales como los del presente ensayo clínico, en lugar de un aceite suplementado, no haya permitido observar más cambios significativos sobre los otros parámetros antropométricos evaluados.

### 1.3.2. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico en la capacidad antioxidante y la peroxidación lipídica.

La capacidad antioxidante fue valorada aplicando tres métodos complementarios: FRAP, ABTS y ORAC. De acuerdo a los datos reportados en la Tabla 4, los valores de ORAC ( $p=0,043$ ) aumentaron significativamente como consecuencia de la interacción del producto (AOO y AGAO) con el grupo (normo- e hipercolesterolémico). Atendiendo a las tasas de cambio, en el grupo de sujetos sanos hubo una tendencia ascendente después de ambas intervenciones dietéticas, siendo más pronunciada tras la ingesta de AOO, mientras que en el grupo de riesgo hubo una tendencia descendente y ascendente tras el consumo de AOO, mostrando un comportamiento contrario en los sujetos hipercolesterolémicos, en los que sólo el AGAO pareció aumentar los valores de ORAC (Tabla 4).

Sin embargo, este aumento en la capacidad antioxidante en suero no se vio reflejado en un menor daño oxidativo a macromoléculas, en concreto en lípidos. Así, los valores de LDLox determinados en las muestras de suero no mostraron variaciones significativas a lo largo del ensayo por efecto del consumo de AOO o AGAO. Diferentes ensayos *in vitro* han evaluado el efecto de distintos compuestos presentes en el AOO como son el eritrodiol, el uvaol, el ácido oleanólico y el ácido maslínico. Con todos ellos se han descrito resultados positivos al minimizar la peroxidación lipídica (revisado por Mateos y cols., 2020). Además, en un reciente estudio de intervención donde complementaron la dieta de mujeres postmenopáusicas con un subproducto rico en escualeno (otro componente característico del AOO), también se observó una disminución de los niveles de LDLox en suero (Casado-Díaz y cols., 2017). Todos estos resultados guardan relación con los descritos por Conterno y cols. (2019), quienes observaron una tendencia descendente en los niveles de LDLox en sujetos hipercolesterolémicos que consumieron

galletas enriquecidas con polvo de orujo de oliva durante 8 semanas. Por lo tanto, estos resultados evidencian el interés de realizar más ensayos clínicos con AOO enriquecido con triterpenos pentacíclicos en sujetos con niveles elevados de colesterol para confirmar el posible efecto protector de este aceite en los niveles de LDLox.

Además, es importante señalar que tanto el AOO como el AGAO son dos fuentes grasas con un alto contenido en vitamina E (AOO: 357 mg/kg; AGAO: 420 mg/kg), tal como se muestra en la Tabla Suplementaria S1 del artículo I. Este alto contenido en vitamina E es de gran interés considerando que este micronutriente ha demostrado proteger a las células frente al daño oxidativo, tal como se recoge en el listado de declaraciones autorizadas por la Unión Europea sobre propiedades saludables de los alimentos (Reglamento (CE) nº 432/2012). Sin embargo, el alto contenido de tocoferoles de los dos aceites y la mayor ingesta de vitamina E tras la intervención nutricional en ambos grupos de voluntarios (Tabla 2 del artículo I) no fue suficiente para modificar los niveles de LDLox.

Tabla 4 Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva (AOO) y aceite de girasol alto oleico (AGAO) en capacidad antioxidante en suero y daño oxidativo a lípidos.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>FRAP (µM)</b>							
Inicial	498 ± 19	511 ± 26	584 ± 31	614 ± 31	-	-	-
Final	523 ± 21	543 ± 27	636 ± 40	622 ± 35	-	-	-
Tasa de cambio	5,9 ± 2,5	7,6 ± 3,4	8,7 ± 2,9	1,5 ± 2,8	0,070	0,621	0,153
<b>ORAC (nM)</b>							
Inicial	23 ± 1	23 ± 1	26 ± 2	24 ± 2	-	-	-
Final	25 ± 2	22 ± 1	24 ± 2	24 ± 1	-	-	-
Tasa de cambio	8,6 ± 4,4	1,1 ± 6,0	-5,6 ± 4,8	9,4 ± 5,3	0,321	0,853	0,043

Continuación Tabla 4.

	Normocolesterolémicos (n=34)		Hipercolesterolémicos (n=30)		<i>p</i> valor		
	AOO	AGAO	AOO	AGAO	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>ABTS (μM)</b>							
Inicial	7460 ± 247	7399 ± 264	7151 ± 238	7148 ± 278	-	-	-
Final	7886 ± 312	7938 ± 411	7747 ± 338	7699 ± 348	-	-	-
Tasa de cambio	5,8 ± 2,4	7,2 ± 3,5	7,9 ± 2,5	8,0 ± 2,6	0,861	0,395	0,866
<b>LDLox (ng/mL)</b>							
Inicial	455 ± 86	336 ± 51	510 ± 70	466 ± 72	-	-	-
Final	395 ± 61	372 ± 55	445 ± 56	454 ± 68	-	-	-
Tasa de cambio	22,5 ± 13,8	17,8 ± 16,7	25,2 ± 20,1	16,4 ± 11,3	0,274	0,472	0,597
<b>MDA (nmol/mL)</b>							
Inicial	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,08	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	-	-	-
Final	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	-	-	-
Tasa de cambio	-5,1 ± 3,4 <sup>a</sup>	3,1 ± 3,2 <sup>b</sup>	-1,6 ± 2,6	-8,4 ± 4,7	0,861	0,153	0,007

Los valores representan la media ± SEM. La tabla muestra los valores medios iniciales (pretratamiento) y finales (postratamiento). La tasa de cambio se calculó a partir de los valores iniciales y finales como [(valor final-valor inicial)/valor inicial] y se expresó como porcentaje. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal mixto. Los valores *p* de la primera columna corresponden al efecto de tomar el aceite (aceite de oliva -AOO- o aceite de girasol alto oleico -AGAO-), los de la penúltima columna al efecto del grupo [normocolesterolémico (N) o hipercolesterolémico (H)], y la última columna a la interacción del aceite y el grupo. El nivel de significación se fijó en *p*<0,05. FRAP: Ferric ion Reducing Antioxidant Power; ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity; ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); LDLox: lipoproteína de baja densidad oxidada; MDA: malondialdehído.

Por último, los valores medios de MDA (*p*=0,007) determinados en las muestras de suero mostraron variaciones estadísticamente significativas por la interacción del AOO y AGAO con el grupo (normocolesterolémico e hipercolesterolémico) (Tabla 4). De acuerdo con el test de comparaciones múltiples (test de Bonferroni), hubo diferencias debidas al grupo, ya que en el grupo de sujetos sanos se dio un descenso tras la ingesta de AOO y un aumento tras el consumo de AGAO (Tabla 4). Si consideramos que el AOO y el AGAO son dos fuentes grasas con una composición de ácido oleico o  $\alpha$ -tocoferol similar, y que el comportamiento tras la ingesta de ambos aceites vegetales fue distinto, estos resultados pondrían de manifiesto el papel preventivo de los componentes minoritarios del AOO frente al daño oxidativo. Estos son los primeros datos en la

literatura sobre el efecto del AOO en los niveles de MDA, y están en consonancia con antecedentes que muestran el efecto de distintos triterpenos (escualeno o los ácidos maslínico, oleanólico y ursólico) disminuyendo los niveles de MDA en diversos modelos animales de diabetes, hipertensión o inflamación (Mkhwanazi y cols., 2014; Madlala y cols., 2015; Liu y cols., 2016).

### 1.3.3. Grado de aceptación del aceite de orujo de oliva y aceite de girasol alto oleico.

En la última visita del estudio, cuando todos los participantes habían cumplido con las dos intervenciones dietéticas, se procedió a la realización de una encuesta para conocer el grado de satisfacción de los voluntarios con los dos tipos de aceites. De acuerdo a la Figura 19, el sabor, olor y color del AOO recibió una puntuación superior en comparación con el AGAO. Lo mismo sucedió cuando ambos aceites fueron valorados desde el punto de vista culinario. A este respecto, si bien mostraron una puntuación similar en la técnica de fritura, hubo marcadas diferencias cuando el AOO y AGAO se aplicaban en crudo.

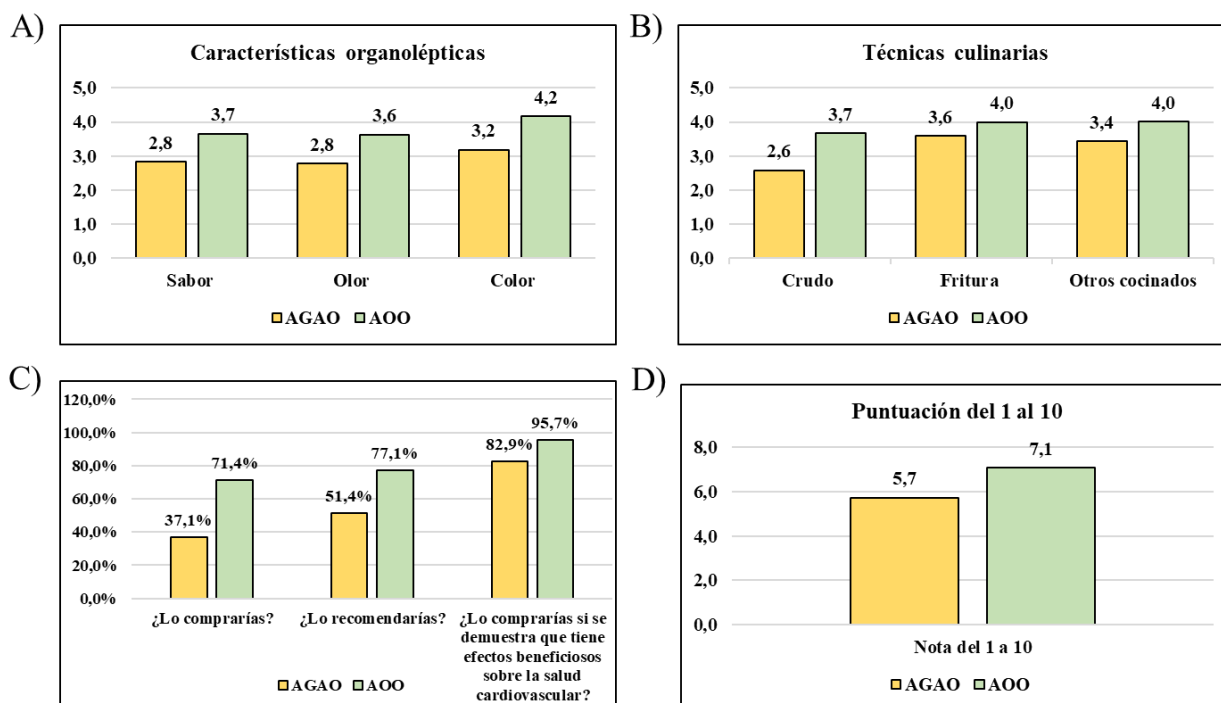


Figura 19. Valoración del grado de aceptación de los voluntarios con el aceite de orujo de oliva (AOO) y el aceite de girasol alto oleico (AGAO). La figura “C” muestra el porcentaje de respuestas afirmativas.

Además, el 71,4% de los participantes afirmó que compraría el AOO si estuviera disponible en el mercado y el 77,1% que lo recomendaría. En relación al AGAO recibió una puntuación inferior, con un 37,1% cuando se les preguntó si lo comprarían en el mercado y un 51,5% si lo recomendarían.

Por último, y según la puntuación global recibida por ambos aceites, el AOO fue mejor valorado por los participantes (con una puntuación de 7,1) en comparación al AGAO (con una puntuación de 5,7).

## **Artículo II.- Evaluación del efecto en salud del aceite de orujo de oliva en comparación con el aceite de girasol en sujetos sanos y con riesgo cardiovascular.**

### **2.1. Resumen**

Tras el estudio de los efectos en salud del consumo a dosis nutricionales del AOO en comparación con el AGAO, ambos aceites con un contenido similar en ácidos grasos monoinsaturados, y ante los resultados satisfactorios obtenidos en este primer ensayo de intervención, se hacía necesario comprobar el efecto del AOO en comparación con el AG. El AG es el segundo aceite más consumido en nuestro país después del AOR. Además de presentar un contenido bajo en los componentes minoritarios destacados en el AOO (ácidos y alcoholes triterpénicos, escualeno, alcoholes grasos alifáticos, etc.), el AG es una grasa preferentemente poliinsaturada. Por tanto, este nuevo estudio permitiría conocer más en profundidad el comportamiento de los componentes bioactivos del AOO en los distintos biomarcadores analizados y la contribución del ácido oleico en los resultados encontrados, a diferencia del estudio anterior, en el que ambos aceites tenían un contenido similar en este ácido graso monoinsaturado.

Para ello, se llevó a cabo un ensayo clínico con un diseño similar al estudio anterior, es decir, se realizó un estudio de intervención nutricional aleatorizado, ciego, cruzado y controlado en 31 sujetos normocolesterolémicos y 37 hipercolesterolémicos, que consumieron durante 4 semanas 45 g/día de AOO o AG como aceite control. En este estudio, durante las etapas inicial y de lavado se empleó aceite de maíz.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el consumo regular de AOO y AG no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre ninguno de los marcadores relacionados con el perfil lipídico, la presión arterial, la glucemia, la tensión arterial y la función endotelial en ambos grupos, excepto en los niveles de eNOS, que estuvieron cerca de alcanzar el nivel de significación por efecto del aceite (AOO y AG) ( $p=0,083$ ). En cambio, sí se observó una disminución del porcentaje de grasa visceral ( $p=0,028$ ) en ambos grupos de voluntarios tras la ingesta de AOO, acompañada de un aumento de la leptina ( $p=0,017$ ) en el grupo hipercolesterolémico. Por otro lado, los cuestionarios realizados para conocer el grado de satisfacción de los voluntarios con los aceites empleados en el estudio (AOO y AG) revelaron que, nuevamente, el AOO tuvo una mejor acogida entre los participantes

del ensayo, con puntuaciones más altas en cuanto a cualidades organolépticas y comportamiento culinario.

En conjunto, estos hallazgos permitieron concluir que la reducción de la grasa visceral tras la ingesta prolongada de AOO podría contribuir a una mejora del estado cardiometabólico, con un efecto potencialmente positivo sobre el tono vascular.

## 2.2. Artículo II

<b>Título</b>	Effect of Olive Pomace Oil on Cardiovascular Health and Associated Pathologies
<b>Autores</b>	Susana González-Rámila, Beatriz Sarriá, Miguel Ángel Seguido, Joaquín García-Cordero, Laura Bravo-Clemente y Raquel Mateos
<b>Revista</b>	Nutrients, 14(19), 3927
<b>Año</b>	2022
<b>DOI</b>	10.3390/nu14193927

Article

# Effect of Olive Pomace Oil on Cardiovascular Health and Associated Pathologies

Susana González-Rámila, Beatriz Sarriá , Miguel Ángel Seguido , Joaquín García-Cordero, Laura Bravo-Clemente  and Raquel Mateos \*

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain

\* Correspondence: raquel.mateos@ictan.csic.es

**Abstract:** Background: olive pomace oil (OPO) is a nutritionally relevant fat due to its high oleic acid content (C18:1) and the presence of a wide range of minor bioactive components. Although numerous in vitro and preclinical studies have been developed to study some of its characteristic components, the health effect of prolonged OPO consumption is unknown. Methods: a randomised, blinded, cross-over, controlled clinical trial was carried out in 31 normocholesterolemic and 37 hypercholesterolemic subjects. Participants consumed 45 g/day of OPO or sunflower oil (SO) for 4 weeks, each preceded by a 3-week run-in/wash-out phase with corn oil (CO). Results: regular consumption of OPO and SO had no statistically significant effect on any of the markers related to lipid profile, blood pressure, and endothelial function in both groups, except for eNOS levels, which were close to statistical significance due to the effect of oil (OPO and SO) ( $p = 0.083$ ). A decrease in visceral fat ( $p = 0.028$ ) in both groups was observed after OPO intake, accompanied by an increment of leptin ( $p = 0.017$ ) in the hypercholesterolemic group. Conclusion: reducing visceral fat after prolonged OPO intake might contribute to improve cardiometabolic status, with a potentially positive effect on the vascular tone. Further clinical trials are needed to confirm the present results.

**Keywords:** cardiovascular health; clinical trial; endothelial function; olive pomace oil; sunflower oil; visceral fat



**Citation:** González-Rámila, S.; Sarriá, B.; Seguido, M.Á.; García-Cordero, J.; Bravo-Clemente, L.; Mateos, R. Effect of Olive Pomace Oil on Cardiovascular Health and Associated Pathologies. *Nutrients* **2022**, *14*, 3927. <https://doi.org/10.3390/nu14193927>

Academic Editors: Egeria Scoditti and Alice J. Owen

Received: 8 August 2022  
Accepted: 19 September 2022  
Published: 22 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cardiovascular disease is the prevalent cause of morbidity and mortality worldwide, affecting millions of individuals every year. One of the most relevant environmental factors contributing to the development of this pathology is the diet [1]. In this sense, the Mediterranean Diet (MD) is considered one of the best models of healthy eating due to its beneficial effects on chronic non-communicable diseases, such as cardiovascular disorders, diabetes, obesity, and inflammation [2]. The main source of fat in this dietary pattern is olive oil [2]. This oil is obtained exclusively from olives and, depending on the technological process to which it is subjected, different commercial categories are obtained: extra virgin olive oil (EVOO), virgin olive oil (VOO), olive oil (OO), mild and intense), and olive pomace oil (OPO) [3]. The health benefits attributed to olive oil consumption, particularly reducing the risk of cardiovascular diseases, have been related to EVOO and VOO consumption due to its preferably monounsaturated fat and its high content of phenolic compounds [4,5]. However, in countries such as Spain, where the olive oil consumption is deeply rooted, the main competitors in the olive market are seed oils (high oleic sunflower oil (HOSO), sunflower oil (SO), etc.) [6]. These oils are mainly used for frying, and their low economic costs are the main reason for their elevated consumption [7,8]. This situation represents an opportunity for OPO because its composition gives the ideal characteristics for frying and, in addition, its market value is quite competitive [9,10].

OPO is obtained from alperujo, a solid by-product consisting of pieces of olive skin, pulp, pits, and stones [3,11]. This oil is characterised by its high oleic acid content, and

its specific composition in minor components, mainly triterpenic acids and dialcohols, squalene, tocopherols, sterols, aliphatic fatty alcohols, and phenolic compounds [3,9]. The refining process carried out on this oil causes the loss of some of the triterpenic acids and phenolic compounds contained in alperujo [3]. However, concentrations of the minor components present in the refined pomace oil are found in amounts that are likely to induce beneficial effects on health, particularly on cardiovascular health [3].

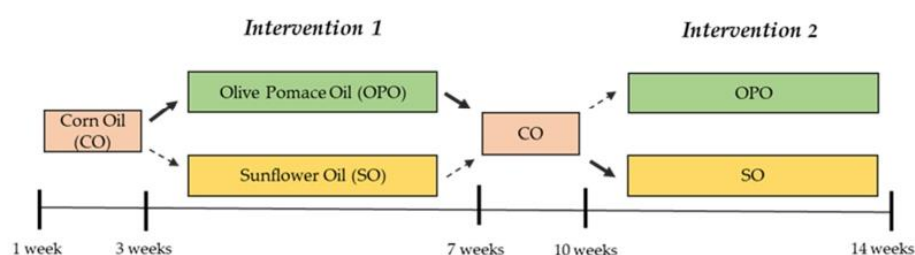
In fact, numerous in vitro and preclinical studies have evaluated one or more components of OPO's minor fraction with promising results [12–15]. In addition, the long-term effect of OPO consumption at nutritional doses has been evaluated in two clinical trials developed by our research group. In the first clinical trial, OPO was compared to HOSO [16], whereas in the second, OPO was compared to SO, a polyunsaturated fat. This present study is focused on the second study. Recently, the comparison of the two clinical trials has been published [17].

Thus, the aim of this study was to determine the possible beneficial role of OPO on biomarkers of cardiovascular health and associated pathologies (hypertension, inflammation, diabetes, and obesity) in healthy volunteers and subjects at cardiovascular risk (hypercholesterolemic volunteers), in order to comparatively test the dietary treatment in both groups. The effect of OPO was compared to SO (control fat), given the high consumption of this seed oil. Corn oil (CO), a seed oil other than SO, was used as run in/wash out oil.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

The study was a randomized, blind, crossover, and controlled clinical trial with a duration of 14 weeks. After a 3-week run-in stage, in which all volunteers consumed CO to wash out the effect of oil consumed in their habitual diet, half of the participants were randomly assigned to the OPO and the other half to the SO oil, both in the healthy and in the at-risk groups. After the first 4-week intervention, a 3-week wash-out period with CO followed, and subsequently, participants consumed the other oil (OPO or SO) during the same period of 4 weeks (Figure 1). Randomization of participants to OPO or SO (control) interventions was performed using Microsoft<sup>®</sup> Excel 2016 software in a 1:1 ratio. Assignment of codes to participants, randomization and allocation to each oil were carried out by different members of the research team. To blind participants, oils were presented in identical plastic bottles with different taps for each type of oil (OPO, SO, and CO).

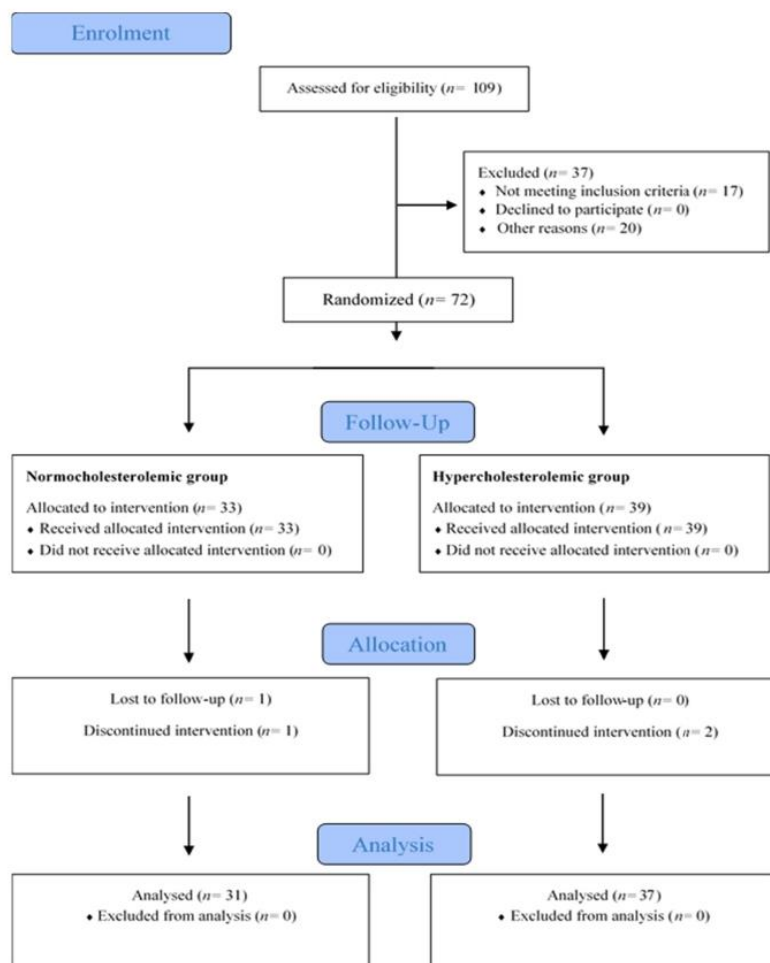


**Figure 1.** Design of the intervention study with olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO). Corn oil (CO) was used during run-in and wash-out.

### 2.2. Participants and Setting

Of the 109 subjects interviewed, the volunteers who met the inclusion criteria (age between 18–55 years, body mass index (BMI) between 18–25 kg/m<sup>2</sup>; specific inclusion criteria for healthy and at-risk volunteers were based on serum lipid levels as stated below), were 43 women and 29 men, aged 19 to 59 years old, with a BMI between 19.0 and 32.0 kg/m<sup>2</sup>. The study groups were formed according to the serum total and LDL-cholesterol (LDL-C) concentrations determined in a pre-screen consented blood analysis. Healthy participants were assigned to the normocholesterolemic group when total cholesterol (TC) and LDL-

C levels were below 200 mg/dL and 135 mg/dL, respectively. At-risk volunteers were assigned to the hypercholesterolemic group when TC was between 200–300 mg/dL and LDL-C between 135–175 mg/dL (Figure 2). The exclusion criteria established were: suffering from acute or chronic pathologies, except hypercholesterolemia for the risk group, having digestive disorders/pathologies (gastric ulcer, Crohn’s disease, inflammatory bowel syndrome, etc.), smoking, pregnant women, vegetarians, on antibiotic treatment three months before starting the study, or taking medication, hormones, or vitamins or dietary supplements.



**Figure 2.** Study flow diagram (Consolidated Standards of Reporting Trials, CONSORT 2010).

The recruitment was conducted between June and September 2019 mainly through our database of participants in previous studies, social networks and by placing flyers at the Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) and at the Complutense University of Madrid campus (UCM). Volunteers interested in the study received additional information by e-mail and telephone. Finally, those who met the inclusion criteria were invited to a meeting to explain the study in detail, and answer questions raised by the attendees. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Universitario Puerta de Hierro, at Majadahonda in Madrid (Spain), and by the Bioethics Committee of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). It also followed the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki for experiments in humans.

Before starting the study, we ensured that we obtained signed informed consent from all participants. The study was registered in Clinical Trials (NCT04998695).

### 2.3. Intervention

The intervention study was conducted during October–December 2019 at the Human Nutrition Unit (HNU) of the ICTAN. All volunteers consumed 45 g/day of oil according to the intervention phase (OPO, SO, and CO) to cover 20% of the daily energy intake of monounsaturated fats (equivalent to 44–67 g/day for 2000–3000 Kcal/d, respectively) following the Spanish Society of Community Nutrition (SENC) recommendations. To this end, one litre of oil per week was provided for family consumption to avoid using any other culinary oil. Participants were required to maintain their dietary and lifestyle habits unchanged, except for some foods rich in mono- and polyunsaturated fat (olives, sunflower seeds, nuts, avocado, margarine, butter, and mayonnaise, except if prepared with the study oils), which were restricted during the study.

### 2.4. Chemical Characterization of the Study Oils

The oils used in the study were analysed according to the following standardized methods: ISO 12228-2:2014 method for the determination of sterols.

Regulation (EEC) N<sup>o</sup>. 2568/91 Annex V for determining triterpenic alcohols.

Regulation (EEC) N<sup>o</sup>. 2568/91 Annex XIX for determining aliphatic alcohols.

Regulation (EEC) N<sup>o</sup>. 2568/91 Annex X for determining fatty acid composition.

ISO 9936:2016 for determining tocopherols and tocotrienols.

Triterpenic acids were analysed following the method of Pérez-Camino & Cert [18], and squalene was determined by gas chromatography [19]. Phenols were analysed by high-performance liquid chromatography with on-line diode array detection (HPLC-DAD) according to the procedure developed by Mateos et al. [20].

### 2.5. Dietary Assessment and Compliance

As indicated in the intervention section, participants were asked to maintain their dietary habits and lifestyle unchanged during the study. To assess if they did, at each visit, participants completed a 24-h questionnaire for the day prior to the visit, and a detailed record of food intake for 72 h, in which they recorded the ingredients, units, or quantity of food, as well as the time and place where they ate. A Manual of Nutrition and Dietetics [21] was provided to the participants to facilitate the interpretation of home food measurements and usual portions. Compliance with food restrictions and the correct intake of oil was controlled by weekly calling and/or emailing participants.

Macronutrients (proteins, carbohydrates, and lipids), dietary fibre and vitamin E intake were calculated using the program DIAL (Department of Nutrition and Bromatology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain), as well as to estimate the total caloric intake.

### 2.6. Blood Sample Collection

Fasting blood samples were collected after an overnight fast using BD Vacuette<sup>®</sup> tubes (Greiner Bio-One GmbH, Kirchdorf an der Krems, Austria) with EDTA or without anticoagulant to separate plasma and serum, respectively. Subsequently, samples were centrifuged, aliquoted, and stored at −80 °C until analysis.

### 2.7. Primary Outcomes and Other Outcomes Measures

Primary outcomes were markers related to cardiovascular health: lipid profile, blood pressure, and endothelial function. Secondary outcomes were biomarkers associated with diabetes, obesity, and inflammation.

### 2.7.1. Biochemical Analysis

Biochemical analysis of metabolic markers in serum was performed following procedures of reference as established by the Spanish Society of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology (Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)). TC, triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, apolipoprotein A1 (Apo A1), and apolipoprotein B (Apo B) were determined using a Roche Cobas Integra 400 plus analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). In addition, the Friedewald formula was used to estimate LDL-C and VLDL (very low-density lipoprotein) content, and Apo B/Apo A1, LDL/HDL, and TC/HDL ratios were calculated. Alanine (ALAT) and aspartate (ASAT) aminotransferases were analysed spectrophotometrically following standard procedures.

### 2.7.2. Blood Pressure

Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured with an OMRON<sup>®</sup> M2 HEM-7121-E sphygmomanometer (OMRON HEALTHCARE Co., Ltd., Kyoto, Japan). Participants rested in a sitting position for 15 min before measurement, which was taken in triplicate in the non-prevailing arm, waiting 5 min between each.

### 2.7.3. Endothelial Function

Circulating levels of E-selectin, P-selectin, and the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were determined in plasma by ELISA following the protocols of Cloud-Clone Corp. (Katy, TX, USA). Spectrophotometric reading was performed using a Bio-Tek<sup>®</sup> Synergy<sup>™</sup> HT Multi-Detection microplate reader controlled by BioTek<sup>®</sup> Gen5 software version 2.01.14 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Intercellular (ICAM-1) and vascular (VCAM-1) adhesion molecules were determined in serum samples with Bio-Plex<sup>®</sup> Pro Human Cytokine ICAM-1 and VCAM-1 kits (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a MAGPIX<sup>™</sup> Multiplex fluorescence reader operating with the Bio-Plex Pro Wash Station and the Bio-Plex Manager<sup>™</sup> MP software for data processing (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

### 2.7.4. Diabetes and Obesity Biomarkers Analysis

Glucose, insulin, and glycosylated haemoglobin (HbA1c) were determined in serum samples following recommendations of the Spanish Society of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology (SEQC). From the glucose and insulin data, insulin resistance (HOMA-IR) and pancreatic beta-cell function (HOMA- $\beta$ ) were calculated according to the mathematical model known as HOMA (Homeostasis Model Assessment) proposed by Matthews et al. [22]:  $HOMA-IR = [Glucose (mg/dL) \times Insulin (mU/L)] / 405$ ;  $HOMA-\beta = [(360 \times Insulin (mU/L)) / (Glucose (mg/dL) - 63)]$ . In addition, insulin sensitivity was determined using the QUICKI ("Quantitative Insulin Sensitivity Check Index"), based on a logarithmic model calculated from fasting glucose and insulin concentrations using the following equation  $QUICKI = 1 / [\log Insulin (mU/L) + \log Glucose (mg/dL)]$ .

The hormones insulin, glucagon, incretin gastric inhibitory polypeptide (GIP), as well as glucagon-like peptide type 1 (GLP-1), C-peptide, and ghrelin; along with the adipokines leptin, resistin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), visfatin, adiponectin, and adipsin were analysed in serum samples using the Bio-Plex<sup>®</sup> Pro<sup>™</sup> Human Diabetes Panel 10-Plex kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in the MAGPIX<sup>™</sup> Multiplex fluorescence reader and Bio-Plex Manager<sup>™</sup> MP software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

### 2.7.5. Anthropometry and Body Composition

Height and body perimeters (waist, abdomen, and brachial) were measured in triplicate using a wall-mounted height measuring rod (Soehnle Professional, GmbH, Backnang, Germany) and a tape measure (Fisaude ADE, Madrid, Spain), respectively. Weight, visceral, and body fat percentages were estimated by single-frequency tetrapolar electrical

bioimpedance using a Tanita® BC 601 segmental body composition analyser with a digital scale included (Tanita Europe BV, Amsterdam, The Netherlands).

#### 2.7.6. Inflammatory Biomarker Analysis

Pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12(p70), IL-17) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10 and IL-13) interleukins (IL), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), as well as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 $\beta$ ), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), and granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) were analysed in serum samples using Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Grp I Panel 17-Plex kits in the MAGPIX™ Multiplex fluorescence reader and Bio-Plex Manager™ MP software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). In addition, high-sensitivity C-reactive protein (CRP) was also determined in serum samples with an automated ultra-sensitive turbidimetric method (AU2700 Chemistry Analyzer, Olympus Corp., Japan).

#### 2.7.7. Antioxidant Capacity and Oxidation Biomarkers

Antioxidant activity was measured in serum samples by the ABTS radical cation [23] and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) methods [24], and the reducing capacity was determined by the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay [25]. Trolox was used as standard, and results were expressed as  $\mu$ M of Trolox equivalent (TE). Low-density lipoprotein oxidation (LDLox) levels were determined in serum samples by ELISA assay according to the protocols of the Cloud-Clone Corp. kit (Katy, TX, USA). These parameters were analysed using a Bio-Tek® Synergy™ HT Multi-Detection plate reader (Highland Park, Winooski, Vermont 05404-0998 USA) controlled by BioTek® Gen5 software version 2.01.14.

Malondialdehyde (MDA) levels, a biomarker of lipid oxidation, was determined in serum samples by high-performance liquid chromatography (HPLC) following the methodology proposed by Mateos et al. [26]. For this purpose, a 1200 series HPLC equipment (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a Nucleosil 120 C18 column (25 mm  $\times$  0.46 mm, particle size 5  $\mu$ m, TeknoKroma, Barcelona, Spain) were used.

#### 2.8. Sample Size Calculation and Statistical Analysis

To estimate the sample size, the G\*Power 3.1.9.7 program was used, considering TC concentration as the main variable and the study design [randomized, blind, crossover, and controlled clinical trial, in which all subjects consumed both test (OPO) and control oils (SO)]. Other premises considered, following previous studies with a similar design, were: a statistical power of 80%, a level of significance of 0.05, two tail, a standard deviation of 25, mean of pre-post differences of 13.4 units, and an effect size of 0.54 [27]. A sample size of 30 volunteers was established. Finally, considering their TC and LDL-C concentration, 72 subjects were recruited and allocated in the normocholesterolemic or hypercholesterolemic groups, although only  $n = 31$  healthy and  $n = 37$  at risk volunteers completed the study. These numbers were higher than the sample size of 30 initially calculated and allowed for adequate statistical analysis.

For the statistical design, the following factors were considered as two fixed effects: group (normocholesterolemic/hypercholesterolemic) and treatment (OPO/SO, repeated measures), and the order of oil intake (starting with OPO or SO within each group) was considered as a random effect.

The statistical models applied to analyse the results of this study were:

1. A general linear repeated measures model to study energy, macronutrient, and micronutrient intake throughout the study, considering that the order of intake of the test and control oils would not affect the overall dietary pattern of the volunteers. In each group (normocholesterolemic and hypercholesterolemic), baseline, initial (pre-treatment), and final (post-treatment) results with OPO and SO were compared. Results are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

2. A linear mixed model was applied to study the rate of change [(final value—initial value)/initial value] of each variable. This statistical model considers the order of intake of the oils, presenting the data in a correlated and non-constant variability form. This statistical model was also applied to the initial and final mean values. The statistical model was full factorial, considering that group (normocholesterolemic hypercholesterolemic), treatment oil (OPO and SO) and interaction group\*treatment. Pre- and post-treatment data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and the rate of change is expressed as a percentage  $\pm$  SEM.

Normality of data distribution was verified by the Kolmogorov-Smirnov test, and a box-plot analysis was performed for all variables before statistical analysis. In addition, the Bonferroni test (within each group) was applied to compare pairwise the effect of the intake of each oil (OPO and SO). The significance level was set at  $p < 0.05$ . Data were analysed using SPSS software (version 27.0; SPSS, Inc., IBM Company, Armonk, NY, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Chemical Composition of the Study Oils

The chemical characterisation of OPO, SO, and CO is shown in Table 1. OPO was a monounsaturated fat with an oleic acid (C18:1) content of 74.32%, followed by palmitic acid (C16:0), and linoleic acid (C18:2) with a content of 10.78% and 9.02%, respectively. Linoleic acid (C18:2) was the main fatty acid in SO (58.46%) and in corn oil (CO) (50.52%), followed by oleic acid (C18:1), with a content of 29.76% in SO and 35.36% in CO. As for minor components, squalene was present in the three oils, with a higher concentration in OPO (675 ppm) compared to SO (314 ppm) and CO (548 ppm). In the case of tocopherols, while OPO (195 mg/kg) and SO (217 mg/kg) showed a high content of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E), CO stood out for its  $\gamma$ -tocopherol content (205 mg/kg). Tocotrienols were only detected in CO (19 mg/kg). Regarding sterols composition, the content was highest in CO (8962 ppm), followed by OPO (3344.2 ppm) and SO (2820.5 ppm). However, it should be noted that triterpenic alcohols (745 mg/kg) and triterpenic acids (191 mg/kg), as well as aliphatic alcohols (1681 mg/kg), were mainly detected in OPO, compared to their low or no content in SO and CO, respectively. Finally, the phenol content was below 2 mg/kg in the three oils (Table 1).

**Table 1.** Chemical composition of olive pomace oil (OPO), sunflower oil (SO), and corn oil (CO).

	OPO	SO	CO
Fatty acids (%)			
C 12:0 (Lauric acid)	-	<0.01	0.01
C 14:0 (Myristic acid)	0.02	0.08	0.04
C 16:0 (Palmitic acid)	10.78	6.43	10.60
C 16:1 (Palmitoleic acid)	0.84	0.14	0.15
C 17:0 (Margaric acid)	0.06	0.03	0.07
C 17:1 (Margaroleic acid)	0.10	0.03	0.05
C 18:0 (Stearic acid)	3.10	3.63	2.03
C 18:1 (Oleic acid)	74.32	29.76	35.36
C 18:2 (Linoleic acid)	9.02	58.46	50.52
C 20:0 (Arachidic acid)	0.48	0.26	0.48
C 18:3 (Linolenic acid)	0.68	0.09	0.04
C 20:1 (Eicosenoic acid)	0.33	0.16	0.31
C 22:0 (Behenic acid)	0.19	0.69	0.17
C 22:1 (Erucic acid)	-	<0.01	<0.01
C 24:0 (Lignoceric acid)	0.08	0.24	0.17
Trans Oleic ( <i>t</i> -C18:1)	0.28	0.03	0.02
Trans Linoleic + Trans Linolenic ( <i>t</i> -C18:2 + <i>t</i> -C18:3)	0.15	0.19	1.15

Table 1. Cont.

	OPO	SO	CO
Squalene (ppm)			
Squalene (ppm)	675	314	548
Tocopherols (mg/kg)			
$\alpha$ -Tocopherol (Vit. E)	195	217	33
$\beta$ -Tocopherol	<2	9	<2
$\gamma$ -Tocopherol	<2	<2	205
$\delta$ -Tocopherol	<2	<2	6
Tocotrienols (mg/kg)			
A-Tocotrienol	-	-	10
$\beta$ -Tocotrienol	-	-	<2
$\gamma$ -Tocotrienol	-	-	5
$\Delta$ -Tocotrienol	-	-	<2
Sterols (%)			
Cholesterol	0.19	0.12	0.21
Brassicasterol	<0.10	<0.1	0.62
24-Methylcholesterol	<0.10	0.12	0.92
Campesterol	3.06	8.40	20.75
Campestanol	0.16	0.07	0.92
Stigmasterol	1.23	6.90	6.85
$\Delta$ 7-Campesterol	<0.10	2.70	<0.10
$\Delta$ 5,23-Stigmastadienol	0.32	0.34	<0.10
Clerosterol	1.08	0.66	0.70
$\beta$ -Sitosterol	88.64	53.67	61.09
Sitostanol	1.44	0.64	2.11
$\Delta$ 5-Avenasterol	1.82	3.08	3.90
$\Delta$ 5,24-Stigmastadienol	1.35	1.08	0.51
$\Delta$ 7-Stigmastenol	0.50	16.29	0.63
$\Delta$ 7-Avenasterol	0.19	5.93	0.78
$\Delta$ -Sitosterol apparent	94.65	59.47	68.31
Total Sterols (ppm)	3344.2	2820.5	8962.0
Triterpenic alcohols (mg/kg)			
Erythrodiol + Uvaol	745	<1.0	<1.0
Phenols (mg/kg)			
Total phenols	<1.0	<1.0	<1.0
Triterpenic acids (mg/kg)			
Oleanolic acid	187	<2.0	<2.0
Ursolic acid	<2.0	<2.0	<2.0
Maslinic acid	<2.0	<2.0	<2.0
Aliphatic alcohols (mg/kg)			
C22 + C24 + C26 + C28	1681	38	29

### 3.2. Baseline Characteristics of Participants and Dietary Control

Of the 109 screened for assessment, only 72 participants were recruited. Two participants dropped out due to incompatibility with their work, one due to medical prescription, and one was lost to follow-up (the study flow diagram is shown in Figure 2). Thus, 68 participants (31 normocholesterolemic and 37 hypercholesterolemic) successfully completed the study. Although an effort was made to ensure equal representation of both sexes in the two groups, at the end there were more normocholesterolemic women (23) than men (8), although hypercholesterolemic men (19) and women (18) were balanced. The baseline characteristics of participants are presented in Table 2. Two hypercholesterolemic

volunteers presented unusually high inflammatory biomarkers (outliers) and thus were excluded in the statistical analysis of inflammation results.

**Table 2.** Baseline characteristics of participants.

	Normocholesterolemic ( <i>n</i> = 31)	Hypercholesterolemic ( <i>n</i> = 37)
Men, <i>n</i>	8	19
Women, <i>n</i>	23	18
Age (years)	30 ± 2	41 ± 2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23 ± 2	26 ± 1
Waist circumference (cm)	78 ± 2	85 ± 2
Total cholesterol (mg/dL)	172 ± 3	239 ± 5
LDL-cholesterol (mg/dL)	93 ± 3	148 ± 5
Systolic blood pressure (mmHg)	110 ± 2	121 ± 2
Diastolic blood pressure (mmHg)	74 ± 1	81 ± 2

Values represent mean ± SEM. BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein.

Table 3 shows energy, macronutrient, micronutrient, and dietary fibre intake during the study. Energy, protein, carbohydrate, and lipid values did not change significantly in both population groups after OPO and SO intervention ( $p < 0.05$ ) (Table 3). These data confirm that the volunteers followed the instructions of not changing their dietary habits during the study. The total caloric intake showed mean values between 1906 and 2081 Kcal/day, slightly below normal limits [28]. In relation to macronutrient intake, the mean values for proteins (84 g/day), carbohydrates (188 g/day), and lipids (92 g/day) represented 16.7%, 37.5%, and 41.3%, respectively. In accordance with the recommended daily intake and nutritional targets for the Spanish population, the data for proteins and lipids were found to be above the recommendations and, in the case of carbohydrates, their values were under the recommendation (50–60% of the total diet) (Table 3) [28].

Saturated fatty acids (SFA) intake values ranged between 28 and 31 g/day (12.6 and 14% of the total diet), above 7–8% of the recommended total daily energy [28]. However, OPO and SO consumption did not show significant variations in SFA values ( $p < 0.05$ ). As for monounsaturated fatty acids (MUFA), significant changes ( $p < 0.001$ ) were observed in both groups after OPO and SO intake. According to the multiple comparisons test, the results showed that, after regular consumption of OPO, there was a significantly increased consumption of this nutrient (with a mean value of 44.5 g/day), reaching 20% of the total energy of the diet [28]. In contrast, MUFA values remained constant after the SO intervention, with an average intake of 29.5 g/day, which represented 13.3% of the total energy [28] (Table 3). This result was expected considering that OPO is a rich source of MUFA compared to SO, whose fat is mostly polyunsaturated (Table 1). Polyunsaturated fatty acid (PUFA) intake showed significant changes ( $p < 0.001$ ) in the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups after the intervention with OPO and SO. The Bonferroni test revealed that, in line with the dietary intervention, after OPO consumption, there was a significant decrease in PUFA intake (11–13 g/day, equivalent to 5–6% of total dietary energy), and an increase after regular intake of SO (29–31 g/day, equivalent to 13–14% of total dietary energy). It is worth mentioning that in the run-in and wash-out stages (before the start with OPO and SO intervention), the mean PUFA values (22–27 g/day, equivalent to 10–12%, respectively) were higher than those observed with basal diet consumption (13.5 g/day, equivalent to 6% of total energy). The reason was that the CO used during these stages (run-in and wash-out) is a rich source of PUFA. The recommendation of 5% PUFA of total dietary energy was close to those achieved after the OPO intervention (5–6% of total dietary energy) and the basal stage (6% of total energy) (Table 3).

**Table 3.** Energy intake and dietary components during the intervention trial with the two oils, olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) \*.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31					<i>p</i> Value **	Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37					<i>p</i> Value **
	OPO		SO				OPO		SO			
	Baseline	Initial	Final	Initial	Final		Baseline	Initial	Final	Initial	Final	
Energy (kcal/day)	1976 ± 70	1906 ± 77	1949 ± 78	1996 ± 85	1982 ± 82	0.314	2081 ± 79	2061 ± 78	2042 ± 72	2025 ± 72	2043 ± 74	0.455
Proteins (g/day)	84 ± 4	78 ± 3	80 ± 3	84 ± 5	81 ± 4	0.621	92 ± 4	88 ± 4	83 ± 4	88 ± 4	81 ± 3	0.103
Carbohydrates (g/day)	187 ± 10	182 ± 12	181 ± 11	186 ± 11	182 ± 10	0.942	195 ± 12	199 ± 10	195 ± 9	188 ± 10	187 ± 10	0.427
Lipids (g/day)	89 ± 4	88 ± 4	90 ± 4	93 ± 4	93 ± 5	0.400	91 ± 4	90 ± 4	93 ± 4	94 ± 4	98 ± 4	0.124
SFA (g/day)	28 ± 2	28 ± 2	28 ± 2	31 ± 2	28 ± 2	0.287	29 ± 2	28 ± 2	28 ± 2	28 ± 2	28 ± 2	0.773
MUFA (g/day)	38 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	44 ± 3 <sup>a</sup>	31 ± 1 <sup>b</sup>	28 ± 2 <sup>b</sup>	0.000	41 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 1 <sup>b</sup>	45 ± 2 <sup>a</sup>	31 ± 1 <sup>b</sup>	31 ± 2 <sup>b</sup>	0.000
PUFA (g/day)	15 ± 1 <sup>a</sup>	22 ± 2 <sup>b</sup>	11 ± 1 <sup>c</sup>	23 ± 2 <sup>bd</sup>	29 ± 2 <sup>d</sup>	0.000	12 ± 1 <sup>a</sup>	23 ± 1 <sup>b</sup>	13 ± 1 <sup>a</sup>	27 ± 1 <sup>bc</sup>	31 ± 2 <sup>d</sup>	0.000
Cholesterol (mg/day)	325 ± 23	308 ± 23	337 ± 23	319 ± 19	340 ± 29	0.668	372 ± 21	311 ± 22	317 ± 24	312 ± 21	351 ± 23	0.067
Dietary fibre (g/day)	20 ± 2	17 ± 1	175 ± 0.1	18 ± 1	20 ± 1	0.137	22 ± 2	22 ± 1	22 ± 1	22 ± 1	22 ± 1	0.964
Vitamin E (mg/day)	9.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	14 ± 1 <sup>b</sup>	17 ± 1 <sup>b</sup>	14 ± 1 <sup>b</sup>	22 ± 2 <sup>c</sup>	0.000	120 ± 14 <sup>a</sup>	121 ± 13 <sup>b</sup>	137 ± 18 <sup>c</sup>	146 ± 13 <sup>c</sup>	114 ± 11 <sup>d</sup>	0.000

\* Values represent mean ± SEM. Data were analysed using a general linear repeated measures model. According to the Bonferroni test, values with different superscript letters correspond to significant differences within the normocholesterolemic N or hypercholesterolemic H groups. *p* values correspond to the effect of taking OPO or SO. Significance level was *p* < 0.05. SFA: saturated fatty acids. MUFA: monounsaturated fatty acids. PUFA: polyunsaturated fatty acids. \*\* Oil (Baseline vs. OPO vs. SO).

### 3.3. Blood Pressure

No significant differences were found in SBP and DBP after the dietary intervention with OPO and SO. However, there were significant differences in SBP and DBP between the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups, when initial and final values were analysed (*p* < 0.05) (Supplementary Table S1). According to the European Society of Cardiology (ESC), all participants maintained blood pressure values within the normal range of <120 mmHg for SBP and <80 mmHg for DBP.

### 3.4. Blood Biochemistry: Lipid Profile and Liver Function

As shown in Table 4, the volunteers' lipid profiles did not change (*p* < 0.05) after prolonged consumption of OPO and SO in either group (normocholesterolemic and hypercholesterolemic). However, the trend towards a decrease in circulating levels of TC, TG, LDL-C, and VLDL-C after OPO intervention in the healthy group is noteworthy. On the other hand, when the linear mixed model was applied to the initial and final values, TC, TG, LDL-C, VLDL-C, LDL-C/HDL-C, TC/HDL-C, Apo A1, Apo B, and Apo B/Apo A1 ratio showed differences between the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups (*p* < 0.05). In relation to the ALAT and ASAT enzymes, there were some differences between the groups at the initial and end of the intervention, with higher values (*p* < 0.05) in the hypercholesterolemic subjects. When the rate of change was analysed, ASAT enzyme also showed significantly higher values in the hypercholesterolemic group compared to the healthy group (*p* = 0.045). However, none of the studied oils had a significant effect on these enzymes.

**Table 4.** Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on lipid profile and liver function \*.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
Total-cholesterol (mg/dL)							
Initial	168 ± 5	168 ± 5	221 ± 5	221 ± 6	0.923	0.000	0.868
Final	164 ± 5	169 ± 5	220 ± 5	220 ± 6	0.642	0.000	0.679
Rate of change	−1.4 ± 2.0	1.1 ± 1.8	−0.3 ± 1.6	−0.1 ± 1.6	0.425	0.907	0.813
Triglycerides (mg/dL)							
Initial	73 ± 5	76 ± 6	111 ± 9	111 ± 11	0.778	0.000	0.884
Final	70 ± 5	72 ± 6	109 ± 9	114 ± 11	0.694	0.000	0.975
Rate of change	−2.6 ± 0.04	−1.8 ± 5.0	1.2 ± 4.0	6.9 ± 5.7	0.486	0.215	0.784
HDL-cholesterol (mg/dL)							
Initial	60 ± 2	60 ± 2	65 ± 3	64 ± 3	0.857	0.146	0.814
Final	59 ± 2	60 ± 2	64 ± 2	63 ± 2	0.676	0.179	0.405
Rate of change	−1.2 ± 1.9	0.8 ± 2.2	0.9 ± 2.0	−2.0 ± 1.9	0.838	0.754	0.342
LDL-cholesterol (mg/dL)							
Initial	93 ± 4	92 ± 4	133 ± 5	134 ± 5	0.919	0.000	0.859
Final	91 ± 4	94 ± 4	134 ± 4	134 ± 5	0.622	0.000	0.801
Rate of change	−0.3 ± 2.8	3.3 ± 2.9	1.1 ± 1.7	1.0 ± 2.2	0.547	0.733	0.657
VLDL-cholesterol (mg/dL)							
Initial	15 ± 1	15 ± 1	24 ± 3	23 ± 3	0.942	0.000	0.713
Final	14 ± 1	14 ± 1	22 ± 2	23 ± 3	0.766	0.000	0.902
Rate of change	−3.0 ± 4.3	−2.8 ± 4.7	0.2 ± 4.5	5.7 ± 5.8	0.267	0.267	0.783
LDL-cholesterol/HDL-cholesterol							
Initial	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.852	0.000	0.823
Final	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.788	0.000	0.874
Rate of change	1.7 ± 3.2	4.3 ± 3.7	1.4 ± 2.3	4.4 ± 3.0	0.315	0.945	0.968
Total Cholesterol/HDL-cholesterol							
Initial	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.2	0.992	0.000	0.990
Final	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2	0.778	0.000	0.866
Rate of change	0.26 ± 1.8	1.32 ± 2.2	−0.3 ± 1.8	2.8 ± 2.0	0.942	0.262	0.615
Apolipoprotein (Apo A1) (mg/dL)							
Initial	161 ± 3	163 ± 3	175 ± 4	177 ± 4	0.635	0.000	0.963
Final	165 ± 4	167 ± 3	183 ± 4	179 ± 5	0.397	0.001	0.333
Rate of change	2.98 ± 1.9	3.0 ± 1.7	4.6 ± 1.1	1.0 ± 1.3	0.195	0.849	0.298
Apo B (mg/dL)							
Initial	72 ± 3	73 ± 3	101 ± 3	100 ± 3	0.974	0.000	0.772
Final	77 ± 3	79 ± 3	108 ± 3	108 ± 4	0.833	0.000	0.580
Rate of change	8.8 ± 2.4	9.5 ± 2.3	8.3 ± 1.9	9.0 ± 1.9	0.768	0.846	0.953
Apo B/Apo A1							
Initial	0.46 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.458	0.000	0.757
Final	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.03	0.875	0.000	0.970
Rate of change	4.3 ± 3.2	6.3 ± 2.7	5.6 ± 2.4	11.3 ± 2.6	0.126	0.420	0.578
ALAT (UI/L)							
Initial	21 ± 2	21 ± 2	24 ± 3	27 ± 3	0.504	0.052	0.608
Final	19 ± 2	20 ± 2	26 ± 3	28 ± 3	0.498	0.005	0.868
Rate of change	107.7 ± 5.0	109.41 ± 7.5	119.8 ± 5.7	117.0 ± 7.1	0.921	0.119	0.782

Table 4. Cont.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
	ASAT (UI/L)						
Initial	20.6 ± 0.9	21.0 ± 1.2	22.7 ± 1.3	24.1 ± 1.3	0.536	0.033	0.322
Final	18.5 ± 0.8	19.2 ± 0.7	22.5 ± 1.2	24.2 ± 1.3	0.275	0.000	0.635
Rate of change	101.7 ± 3.1	106.9 ± 4.7	113.5 ± 4.6	112.4 ± 4.7	0.559	0.045	0.418

\* Values represent mean ± SEM. The table shows the initial (pre-treatment) and final (post-treatment) mean values. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and expressed as percentage. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (OPO or SO), those of the penultimate column to the effect of the group [normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H)], and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p* < 0.05. Apo: Apolipoprotein. ALAT: Alanine aminotransferase. ASAT: Aspartate aminotransferase.

### 3.5. Inflammatory Biomarkers

After OPO and SO intervention, statistically significant changes were observed in IL-4 (*p* = 0.021) and IL-13 (*p* = 0.023). According to Table 5, IL-4 showed important changes by the interaction of the normo- and hypercholesterolemic groups with the oils (OPO or SO), with an increase and a decrease after OPO and SO intake, respectively. With respect to IL-13 (*p* = 0.023), there were significant changes after prolonged consumption of both vegetable oils, with an increase after the OPO intake, and a decrease after the SO consumption (Table 5).

Table 5. Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on inflammatory biomarkers\*.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 35 **		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
	CRP (mg/dL)						
Initial	0.23 ± 0.07	0.25 ± 0.10	0.14 ± 0.03	0.34 ± 0.17	0.222	0.823	0.860
Final	0.17 ± 0.05	0.11 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.04	0.311	0.579	0.438
Rate of change *	39.1 ± 3.1	32.1 ± 0.3	15.1 ± 0.7	17.5 ± 1.1	0.476	0.410	0.815
	IL-1β (pg/mL)						
Initial	0.97 ± 0.06	0.95 ± 0.03	0.89 ± 0.02	0.91 ± 0.03	0.785	0.097	0.691
Final	0.92 ± 0.03	0.91 ± 0.03	0.89 ± 0.02	1.05 ± 0.15	0.311	0.980	0.335
Rate of change	−2.4 ± 2.8	−3.2 ± 2.8	4.6 ± 2.3	0.8 ± 14.1	0.449	0.202	0.259
	IL-2 (pg/mL)						
Initial	16.4 ± 0.7	16.6 ± 0.5	15.4 ± 0.3	15.9 ± 0.5	0.308	0.147	0.766
Final	16.0 ± 0.5	15.6 ± 0.5	15.3 ± 0.4	15.6 ± 0.5	0.573	0.488	0.433
Rate of change	0.1 ± 2.3	−5.2 ± 2.3	−0.4 ± 1.8	−1.4 ± 2.3	0.193	0.544	0.370
	IL-4 (pg/mL)						
Initial	2.68 ± 0.06	2.64 ± 0.06	2.57 ± 0.05	2.61 ± 0.05	0.907	0.217	0.430
Final	2.64 ± 0.06	2.59 ± 0.07	2.55 ± 0.04	2.62 ± 0.07	0.515	0.762	0.137
Rate of change	0.7 ± 2.3	−3.0 ± 2.3	2.5 ± 1.6	−1.6 ± 2.1	0.778	0.229	0.021
	IL-6 (pg/mL)						
Initial	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2	0.947	0.206	0.258
Final	5.3 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.0 ± 0.2	5.2 ± 0.2	0.986	0.571	0.668
Rate of change	3.5 ± 4.4	−2.1 ± 4.4	−3.0 ± 4.3	5.0 ± 3.3	0.816	0.885	0.169

Table 5. Cont.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 35 **		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
IL-7 (pg/mL)							
Initial	33 ± 1	34 ± 1	33 ± 1	34 ± 1	0.388	0.613	0.782
Final	34 ± 1	34 ± 1	33 ± 1	33 ± 1	0.692	0.610	0.856
Rate of change	2.3 ± 2.5	−1.2 ± 2.5	0.6 ± 1.7	−1.0 ± 2.3	0.252	0.777	0.641
IL-8 (pg/mL)							
Initial	22 ± 2	24 ± 2	20 ± 1	21 ± 1	0.634	0.057	0.861
Final	21 ± 1	21 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	0.871	0.633	0.874
Rate of change	−5.6 ± 3.8	−3.2 ± 3.8	3.0 ± 2.5	−3.0 ± 2.2	0.204	0.113	0.568
IL-10 (pg/mL)							
Initial	10.9 ± 0.2	11.1 ± 0.3	10.8 ± 0.3	10.7 ± 0.2	0.319	0.260	0.677
Final	11.0 ± 0.2	10.8 ± 0.2	10.9 ± 0.3	10.6 ± 0.2	0.883	0.552	0.233
Rate of change	1.9 ± 1.6	−2.6 ± 1.6	−0.3 ± 1.1	0.9 ± 1.6	0.310	0.686	0.080
IL-12 (p70) (pg/mL)							
Initial	12.1 ± 0.3	12.4 ± 0.3	11.7 ± 0.3	11.9 ± 0.2	0.287	0.091	0.838
Final	12.2 ± 0.3	11.9 ± 0.3	11.7 ± 0.2	12.0 ± 0.3	0.957	0.565	0.253
Rate of change	1.5 ± 2.5	−4.1 ± 2.5	0.9 ± 1.7	1.0 ± 1.7	0.200	0.293	0.182
IL-13 (pg/mL)							
Initial	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	0.345	0.045	0.992
Final	3.1 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	0.826	0.142	0.437
Rate of change	2.8 ± 2.8	−5.2 ± 2.8	1.0 ± 1.9	−0.7 ± 3.0	0.023	0.527	0.159
IL-17 (pg/mL)							
Initial	13.9 ± 0.4	14.0 ± 0.3	13.4 ± 0.3	13.5 ± 0.2	0.475	0.199	0.875
Final	14.0 ± 0.4	13.8 ± 0.4	13.3 ± 0.2	13.5 ± 0.3	0.936	0.143	0.489
Rate of change	0.8 ± 2.1	−0.7 ± 2.1	−0.2 ± 1.6	0.3 ± 1.6	0.773	0.997	0.570
G-CSF (pg/mL)							
Initial	137 ± 3	140 ± 2	134 ± 2	134 ± 2	0.456	0.041	0.453
Final	137 ± 2	137 ± 3	133 ± 2	135 ± 2	0.875	0.150	0.547
Rate of change	0.9 ± 1.7	−1.7 ± 1.7	−0.4 ± 1.0	0.8 ± 1.2	0.618	0.711	0.185
GM-CSF (pg/mL)							
Initial	4.7 ± 0.2	4.7 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.6 ± 0.2	0.726	0.929	0.911
Final	4.7 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.8 ± 0.3	0.746	0.772	0.329
Rate of change	0.9 ± 2.6	−2.4 ± 2.6	−1.6 ± 2.3	4.4 ± 3.3	0.651	0.472	0.114
MCP-1 (pg/mL)							
Initial	39 ± 3	37 ± 4	33 ± 2	33 ± 2	0.909	0.088	0.949
Final	35 ± 6	34 ± 3	31 ± 1	32 ± 2	0.574	0.243	0.416
Rate of change	−2.9 ± 3.8	−6.5 ± 3.8	−1.7 ± 3.2	0.3 ± 3.2	0.816	0.273	0.497
MIP-1β (ng/mL)							
Initial	69 ± 6	73 ± 5	71 ± 8	73 ± 8	0.572	0.790	0.793
Final	67 ± 4	66 ± 4	71 ± 8	71 ± 9	0.834	0.453	0.845
Rate of change	4.9 ± 3.9	−8.3 ± 3.9	−1.3 ± 4.1	1.4 ± 6.3	0.361	0.774	0.133

Table 5. Cont.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 35 **		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
TNF- $\alpha$ (pg/mL)							
Initial	23.1 $\pm$ 0.9	23.7 $\pm$ 0.8	23.3 $\pm$ 1.4	23.9 $\pm$ 1.4	0.633	0.897	0.978
Final	23.0 $\pm$ 0.8	22.4 $\pm$ 0.8	23.3 $\pm$ 1.5	23.4 $\pm$ 1.5	0.888	0.584	0.644
Rate of change	0.5 $\pm$ 1.8	-5.0 $\pm$ 1.8	0.0 $\pm$ 1.4	-1.5 $\pm$ 2.0	0.083	0.567	0.382

\* Values represent mean  $\pm$  SEM. The table shows the initial (pre-treatment) and final (post-treatment) mean values. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and expressed as percentage. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (OPO or SO), those of the penultimate column to the effect of the group [normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H)], and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p* < 0.05. CRP: C reactive protein. IL: Interleukin. G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor. GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. IFN- $\gamma$ : Interferon gamma. MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1. MIP-1 $\beta$ : Macrophage inflammatory protein 1 beta. TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha. \*\* Two hypercholesterolemic volunteers were excluded for statistical analysis due to outliers.

### 3.6. Biomarkers of Endothelial Function

Endothelial function biomarkers (Table 6) showed no significant changes throughout the study according to the linear mixed model applied on the rates of change (*p* < 0.05). However, it is noteworthy that circulating eNOS concentrations were close to the level of significance (set at *p* < 0.05) in both groups, with an increasing and decreasing trend after OPO and SO intake, respectively.

Table 6. Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on endothelial function biomarkers\*.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
eNOS (ng/mL)							
Initial	0.21 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03	0.926	0.647	0.597
Final	0.22 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03	0.944	0.708	0.644
Rate of change	16.03 $\pm$ 0.14	-6.67 $\pm$ 0.09	15.98 $\pm$ 0.14	-4.76 $\pm$ 0.12	0.083	0.903	0.912
E-selectin (ng/mL)							
Initial	11 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	0.260	0.939	0.540
Final	11 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3	11 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	0.588	0.193	0.045
Rate of change	18.0 $\pm$ 0.1	14.4 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.1	16.5 $\pm$ 0.2	0.552	0.342	0.960
P-selectin (ng/mL)							
Initial	214 $\pm$ 18	190 $\pm$ 12	195 $\pm$ 11	195 $\pm$ 11	0.412	0.537	0.469
Final	206 $\pm$ 15	202 $\pm$ 16	179 $\pm$ 12	196 $\pm$ 11	0.635	0.226	0.448
Rate of change	0.60 $\pm$ 0.05	6.86 $\pm$ 0.05	-1.72 $\pm$ 0.06	2.85 $\pm$ 0.04	0.289	0.519	0.871
ICAM-1 (pg/mL)							
Initial	3093 $\pm$ 495	3332 $\pm$ 502	2954 $\pm$ 439	3291 $\pm$ 579	0.546	0.854	0.553
Final	2900 $\pm$ 452	3302 $\pm$ 566	3270 $\pm$ 557	3311 $\pm$ 643	0.705	0.770	0.601
Rate of change	-0.09 $\pm$ 0.05	-1.84 $\pm$ 0.04	9.30 $\pm$ 0.06	-1.88 $\pm$ 0.05	0.120	0.742	0.473

Table 6. Cont.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
VCAM-1 (pg/mL)							
Initial	11,049 ± 2375	11,961 ± 2422	10,716 ± 2081	12,911 ± 2894	0.426	0.909	0.822
Final	11,280 ± 2523	13,101 ± 3152	12,271 ± 2480	13,917 ± 3574	0.522	0.822	0.621
Rate of change	5.44 ± 0.07	10.51 ± 0.08	19.90 ± 0.08	6.11 ± 0.09	0.373	0.856	0.073

\* Values represent mean ± SEM. The table shows the initial (pre-treatment) and final (post-treatment) mean values. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and expressed as percentage. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (OPO or SO), those of the penultimate column to the effect of the group [normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H)], and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p* < 0.05. eNOS: Endothelial nitric oxide synthase. E-selectin: Endothelial selectin. P-selectin: Platelet selectin. ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1. VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1.

### 3.7. Diabetes Markers: Glycaemia, Insulin Levels, Glycosylated Haemoglobin Concentration, Insulin Resistance/Sensitivity Indices (HOMA-IR/QUICKI), and Pancreatic Beta-Cell Function (HOMA-β)

To assess insulin resistance and glycaemic homeostasis, mean glucose, insulin, and HbA1c values were analysed. As shown in Table 7, glucose (*p* = 0.007) showed significant differences after OPO and SO dietary intervention due to the interaction of the group (normo- and hypercholesterolemic) with the studied oils (OPO and SO). According to the Bonferroni test, there were differences between OPO and SO in subjects with normal cholesterol levels. Thus, glucose values increased by 1.3% after OPO intake and decreased by 2.6% after SO intake. In the case of insulin, there were no statistically significant variations throughout the study, although it was close to being significant due to the effect of consuming OPO and SO (*p* = 0.077). Regarding Hb1Ac (*p* = 0.021), the differences occurred between groups, with slightly higher values in the hypercholesterolemic group. Importantly, despite the observed changes in glucose and Hb1Ac, the values of both parameters were within normal levels for the adult population (<6% and <120 mg/dL, respectively) established by the Spanish Diabetes Federation (Federación Española de Diabetes, FEDE). The mathematical models proposed by Matthews et al. [22] to assess insulin resistance (HOMA-IR) and pancreatic beta-cell function (HOMA-β), as well as the QUICKI index calculated for insulin sensitivity, did not show statistically significant differences after consumption of OPO and SO (*p* < 0.05). However, differences were observed between healthy and at-risk subjects in HOMA-IR (*p* = 0.020) and QUICKI (*p* = 0.011) values. Finally, after linear mixed model analysis of initial and final values, HOMA-IR (*p* = 0.006) and QUICKI index (*p* = 0.005) revealed differences between normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects.

Table 7. Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on diabetes markers\*.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
Glucose (mg/dL)							
Initial	80 ± 1	82 ± 1	83 ± 2	81 ± 1	0.938	0.259	0.130
Final	81 ± 1	79 ± 2	83 ± 1	83 ± 1	0.433	0.403	0.944
Rate of change	1.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	−2.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	−0.3 ± 1.2	3.1 ± 1.3	0.825	0.073	0.007

Table 7. Cont.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
Insulin (μUI/mL)							
Initial	7.3 ± 0.8	8.3 ± 0.8	10.2 ± 1.5	8.5 ± 0.9	0.977	0.243	0.579
Final	6.2 ± 0.6	6.8 ± 0.7	9.1 ± 0.9	9.1 ± 1.2	0.918	0.007	0.449
Rate of change	−5.6 ± 6.5	−12.5 ± 5.6	4.7 ± 7.6	8.8 ± 5.9	0.077	0.802	0.825
HbA1c (%)							
Initial	5.30 ± 0.05	5.33 ± 0.04	5.33 ± 0.04	5.36 ± 0.04	0.433	0.403	0.944
Final	5.30 ± 0.04	5.29 ± 0.04	5.33 ± 0.03	5.32 ± 0.04	0.837	0.488	0.949
Rate of change	0.1 ± 0.5	−0.6 ± 0.6	0.0 ± 0.4	−0.8 ± 0.4	0.994	0.021	0.258
HOMA-IR							
Initial	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.2 ± 0.4	1.7 ± 0.2	0.886	0.186	0.674
Final	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.978	0.006	0.560
Rate of change	−3.1 ± 7.4	−14.3 ± 5.8	6.0 ± 8.6	12.4 ± 6.2	0.952	0.020	0.102
HOMA-β							
Initial	174 ± 21	191 ± 27	188 ± 20	140 ± 36	0.503	0.619	0.767
Final	143 ± 14	185 ± 43	186 ± 19	166 ± 15	0.669	0.607	0.185
Rate of change	−8.5 ± 5.3	4.9 ± 5.2	7.1 ± 7.2	−1.7 ± 6.9	0.665	0.633	0.218
QUICKI							
Initial	0.371 ± 0.005	0.363 ± 0.005	0.358 ± 0.006	0.365 ± 0.006	0.931	0.348	0.200
Final	0.379 ± 0.005	0.376 ± 0.006	0.359 ± 0.005	0.363 ± 0.006	0.943	0.005	0.658
Rate of change	2.2 ± 1.3	3.9 ± 1.2	0.7 ± 0.9	−0.7 ± 1.1	0.891	0.011	0.096

\* Values represent mean ± SEM. The table shows the initial (pre-treatment) and final (post-treatment) mean values. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and expressed as percentage. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (OPO or SO), those of the penultimate column correspond to the effect of the group [normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H)], and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p* < 0.05. HbA1c: haemoglobin A1c. HOMA-IR: Homeostatic model to assessment insulin resistance. HOMA-β: Homeostatic model to assess β-cell functionality. QUICKI: Quantitative insulin sensitivity check index.

### 3.8. Obesity Biomarkers

To determine the possible beneficial role of OPO and SO consumption on diabetes and obesity, several biomarkers closely related to these two pathologies were analysed (Table 8). According to the linear mixed model applied to rates of change, the dietary intervention with OPO and SO showed significant changes in the hormones ghrelin (*p* = 0.031) and leptin (*p* = 0.017). Specifically, ghrelin values increased in both groups after OPO and SO intervention, being more marked in cardiovascular risk subjects after SO intake. Regarding leptin, values in healthy subjects decreased by −8.0% after OPO intervention and slightly increased by 1.7% after SO intervention, while there was an increase of 8.6% and 18.6% after OPO and SO intake, respectively, in at-risk subjects. All other variables analysed showed no changes. In addition, belonging to the normocholesterolemic or hypercholesterolemic group had significant effects on C-peptide (initial and final stages), insulin (final stages), and visfatin (final stages) when initial and final values were analysed (*p* < 0.05). On the other hand, adiponectin showed changes due to the effect of the oils (OPO and SO) when final values were compared (*p* = 0.029).

**Table 8.** Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on diabetes and obesity biomarkers\*.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		Oil	<i>p</i> Value	
	OPO	SO	OPO	SO		N/H	N/H × Oil
C-peptide (pg/mL)							
Initial	548 ± 45	546 ± 43	687 ± 63	634 ± 43	0.582	0.030	0.788
Final	489 ± 33	504 ± 38	639 ± 46	630 ± 43	0.937	0.001	0.873
Rate of change	−6.2 ± 4.7	−3.3 ± 4.7	1.9 ± 5.8	1.8 ± 3.7	0.697	0.259	0.723
Ghrelin (pg/mL)							
Initial	319 ± 42	297 ± 26	271 ± 26	252 ± 23	0.642	0.159	0.971
Final	299 ± 38	309 ± 30	250 ± 23	296 ± 26	0.161	0.330	0.543
Rate of change	3.8 ± 7.9	6.0 ± 5.8	2.3 ± 7.4	41.2 ± 20.7	0.031	0.348	0.166
GIP (pg/mL)							
Initial	807 ± 168	840 ± 188	667 ± 29	635 ± 36	0.639	0.281	0.549
Final	770 ± 162	837 ± 188	657 ± 24	647 ± 38	0.847	0.581	0.571
Rate of change	−1.9 ± 5.7	0.2 ± 2.9	0.4 ± 3.0	3.1 ± 2.9	0.554	0.513	0.975
GLP-1 (pg/mL)							
Initial	255 ± 12	252 ± 13	259 ± 9	251 ± 10	0.624	0.852	0.656
Final	261 ± 11	257 ± 10	256 ± 9	256 ± 10	0.842	0.775	0.896
Rate of change	−3.1 ± 7.7	−4.4 ± 7.8	0.1 ± 2.8	4.0 ± 3.4	0.992	0.902	0.274
Glucagon (pg/mL)							
Initial	865 ± 71	807 ± 64	833 ± 54	858 ± 62	0.806	0.871	0.512
Final	906 ± 74	824 ± 71	903 ± 55	869 ± 53	0.351	0.751	0.679
Rate of change	16.8 ± 14.7	5.5 ± 7.1	14.54 ± 6.1	7.97 ± 5.6	0.956	0.480	0.627
Insulin (pg/mL)							
Initial	176 ± 25	200 ± 23	246 ± 33	211 ± 24	0.739	0.114	0.198
Final	150 ± 16	162 ± 20	235 ± 32	234 ± 32	0.841	0.005	0.818
Rate of change	−0.6 ± 9.1	−9.3 ± 9.2	12.0 ± 10.3	15.0 ± 8.1	0.886	0.065	0.807
Leptin (ng/mL)							
Initial	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.6 ± 0.5	3.0 ± 0.4	0.535	0.940	0.645
Final	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.4 ± 0.4	0.593	0.519	0.911
Rate of change	−8.0 ± 5.4	1.7 ± 6.3	8.6 ± 6.8	18.6 ± 98.3	0.017	0.180	0.947
PAI-1 (ng/mL)							
Initial	6.9 ± 0.3	7.0 ± 0.3	7.2 ± 0.5	6.9 ± 0.4	0.815	0.853	0.608
Final	7.1 ± 0.3	6.9 ± 0.3	7.1 ± 0.4	7.2 ± 0.4	0.847	0.565	0.590
Rate of change	4.5 ± 3.3	−1.5 ± 2.8	5.7 ± 6.3	9.3 ± 8.1	0.805	0.459	0.444
Resistin (ng/mL)							
Initial	6.0 ± 0.6	6.6 ± 0.7	6.5 ± 0.6	7.2 ± 1.0	0.179	0.641	0.377
Final	6.1 ± 0.4	6.4 ± 0.6	6.1 ± 0.6	6.3 ± 0.5	0.744	0.969	0.858
Rate of change	22.1 ± 0.217.5	8.1 ± 10.4	5.5 ± 11.7	11.7 ± 24.7	0.826	0.221	0.719
Visfatin (ng/mL)							
Initial	1.53 ± 0.09	1.36 ± 0.08	1.63 ± 0.06	1.56 ± 0.07	0.100	0.097	0.596
Final	1.44 ± 0.07	1.48 ± 0.16	1.62 ± 0.07	1.62 ± 0.07	0.764	0.050	0.971
Rate of change	−5.3 ± 2.2	3.9 ± 20.6	0.5 ± 3.0	5.7 ± 4.2	0.724	0.091	0.470
Adiponectin (ng/mL)							
Initial	39 ± 8	56 ± 12	71 ± 17	78 ± 21	0.157	0.264	0.461
Final	49 ± 9	61 ± 20	91 ± 29	63 ± 15	0.029	0.793	0.916
Rate of change	20.4 ± 33.1	63.1 ± 28.2	54.4 ± 28.8	−69.8 ± 36.9	0.205	0.081	0.098

Table 8. Cont.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
Adipsin (pg/mL)							
Initial	660 ± 68	677 ± 107	853 ± 92	815 ± 91	0.866	0.072	0.739
Final	619 ± 73	600 ± 65	716 ± 64	664 ± 61	0.523	0.190	0.619
Rate of change	4.6 ± 13.2	9.6 ± 11.1	−6.0 ± 1.0	−6.5 ± 9.1	0.969	0.260	0.621

\* Values represent mean ± SEM. The table shows the initial (pre-treatment) and final (post-treatment) mean values. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and expressed as percentage. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (OPO or SO), those of the penultimate column correspond to the effect of the group [normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H)], and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p* < 0.05. GIP: Gastric inhibitory polypeptide. GLP-1: Glucagon like peptide 1. PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1.

### 3.9. Anthropometric Measurements and Body Composition

Table 9 shows how 4-week consumption of OPO and SO significantly affected visceral fat percentage (*p* = 0.028). In detail, there was a decrease of −4.5% (normocholesterolemic group) and −1.4% (hypercholesterolemic group) after OPO intake, and an increase of 2.2% (normocholesterolemic group) and 6.6% (hypercholesterolemic group) after SO intake. The other parameters assessed were not affected after the intake of both vegetable oils (OPO and SO). However, when healthy subjects were compared with those at-risk, differences in BMI (*p* = 0.050) and body fat (*p* = 0.058) values were observed. These differences between groups were also observed in weight (initial and final stages), BMI (initial and final stages), visceral fat (initial and final stages), waist circumference (initial and final stages), hip circumference (late stages), and arm circumference (initial and final stages) (*p* < 0.05), when the statistical analysis was performed on initial and final values (Table 9).

Table 9. Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on anthropometric measurements and body composition\*.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
Weight (kg)							
Initial	64.1 ± 2.1	64.0 ± 2.1	74.1 ± 2.6	74.1 ± 2.7	0.990	0.000	0.967
Final	63.9 ± 2.1	64.0 ± 2.1	74.2 ± 2.7	74.2 ± 2.7	0.945	0.000	0.967
Rate of change	−0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.660	0.272	0.545
BMI (kg/m <sup>2</sup> )							
Initial	23.9 ± 0.7	23.7 ± 0.7	26.0 ± 0.7	26.0 ± 0.7	0.893	0.002	0.976
Final	23.8 ± 0.7	23.8 ± 0.7	26.1 ± 0.7	26.1 ± 0.7	0.930	0.001	0.980
Rate of change	−0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.365	0.050	0.805
Body fat (%)							
Initial	25.5 ± 1.5	24.8 ± 1.5	26.2 ± 0.7	26.0 ± 0.7	0.803	0.512	0.845
Final	25.9 ± 1.3	25.2 ± 1.5	26.1 ± 0.7	25.8 ± 0.7	0.844	0.805	0.818
Rate of change	1.1 ± 2.3	−1.0 ± 1.1	3.3 ± 2.4	3.8 ± 2.2	0.848	0.058	0.714
Visceral fat (%)							
Initial	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.5	7.3 ± 0.7	7.0 ± 0.7	0.794	0.000	0.935
Final	3.4 ± 0.5	3.4 ± 0.5	7.2 ± 0.7	7.1 ± 0.7	0.822	0.000	0.867
Rate of change	−4.5 ± 2.7	2.2 ± 4.0	−1.4 ± 1.5	6.6 ± 6.1	0.028	0.490	0.636

Table 9. Cont.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> Value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H × Oil
Waist circumference (cm)							
Initial	75.8 ± 1.8	76.6 ± 2.2	84.5 ± 2.3	85.6 ± 2.5	0.545	0.000	0.863
Final	74.7 ± 1.8	76.0 ± 2.0	83.7 ± 2.3	85.1 ± 2.3	0.548	0.000	0.997
Rate of change	−1.2 ± 0.9	−0.7 ± 0.9	−1.0 ± 0.4	−0.5 ± 0.8	0.467	0.935	0.884
Hip circumference (cm)							
Initial	96.1 ± 1.5	96.0 ± 1.7	99.7 ± 1.2	98.8 ± 1.6	0.973	0.053	0.886
Final	97.6 ± 1.4	96.7 ± 1.7	100.2 ± 1.3	99.2 ± 1.6	0.848	0.001	0.948
Rate of change	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.9	0.6 ± 0.4	1.1 ± 0.9	0.534	0.616	0.538
Arm circumference (cm)							
Initial	28.5 ± 0.6	28.3 ± 0.6	30.5 ± 0.6	30.4 ± 0.6	0.848	0.001	0.948
Final	28.3 ± 0.6	28.6 ± 0.7	30.3 ± 0.6	30.5 ± 0.6	0.945	0.002	0.920
Rate of change	−0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.4	−0.7 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.130	0.962	0.559

\* Values represent mean ± SEM. The table shows the initial (pre-treatment) and final (post-treatment) mean values. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and expressed as percentage. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (OPO or SO), those of the penultimate column correspond to the effect of the group [normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H)], and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p* < 0.05. BMI: Body mass index.

### 3.10. Antioxidant Capacity and Oxidation Biomarkers

The consumption of OPO and SO had no effect on any of the parameters used to assess the oxidative status of the participants (*p* < 0.05). However, belonging to the normocholesterolemic or hypercholesterolemic group influenced FRAP values (*p* = 0.013). In addition, initial and final FRAP and LDLox values showed variations between the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups, with slightly higher values in the at-risk group (*p* < 0.05) (Supplementary Table S2).

## 4. Discussion

The MD is one of the best-studied diets because of its beneficial, protective effect against chronic and inflammatory diseases. One of the most well-known and important characteristics of this diet is the use of olive oil as the principal source of energy from fat [2]. All varieties of olive oil (EVOO, VOO, OO, and OPO) are characterised by their high oleic acid content and their wide variety of bioactive compounds, while chemical composition depends on the extraction method [3]. OPO is obtained from the residue remaining after mechanical extraction of the VOO [9]. Although it is refined to make it suitable for consumption, it remains a rich source of triterpenic acids and dialcohols, squalene, tocopherols, sterols, and aliphatic fatty alcohols [3]. Numerous in vitro and preclinical studies have been conducted on some of the minor components of OPO showing promising results in the prevention of cardiovascular diseases and their risk factors, modulating lipid profile, improving endothelial function, inducing hypotensive effects, lowering inflammation levels, and improving biomarkers related to the prevention of diabetes and obesity [3]. However, the possible effects on human health following prolonged OPO consumption remain unknown. Therefore, a randomized, blinded, crossover, controlled clinical trial with OPO, analysing numerous biomarkers related to heart disease and associated pathologies (obesity, diabetes, and inflammation) has been carried out.

#### 4.1. Chemical Composition of the Study Oils

OPO is mainly a monounsaturated fat thanks to its high oleic acid (C18:1) content in comparison with SO and CO, and it is richer in linoleic acid (C18:2). These results were in line with those recently reported by Holgado et al. [29], who characterized three different brands of OPO and SO. The oleic acid (72.02–73.8% for OPO; 28.38–32.16% for SO) and linoleic acid (9.5–11.1% for OPO; 56.6–60.0% for SO) content was similar to those quantified in our study oils (Table 1). These authors also analysed other minor components, with some differences between the OPO used in this study and those characterized by Holgado et al. [29]. The three different OPO analysed by these authors showed a higher content of squalene (742–1538 mg/kg), tocopherols (301–446 mg/kg), and phenolic compounds (8–15 mg/kg), and a lower amount of aliphatic fatty alcohols (1677–2269 mg/kg) than the OPO used in this intervention study (squalene: 675 mg/kg; tocopherols: 201 mg/kg; phenolic compounds < 2 mg/kg; aliphatic fatty alcohols: 1681 mg/kg, Table 1). Regarding CO composition, oleic acid, linoleic acid, and total sterol content show a similar level to that reported by Güneşer et al. [30].

#### 4.2. Effect of Nutritional Intervention on Lipid Profile, Blood Pressure, and Markers of Liver Function and Endothelial Function

Prolonged consumption of OPO and SO did not induce changes ( $p < 0.05$ ) in any of the biomarkers analysed related to lipid profile and liver function (Table 4). Although the hypolipidemic effect of OPO had not been tested before, numerous *in vivo* and *in vitro* studies performed with OPO components (mainly triterpenic acids and aliphatic fatty alcohols) showed a favourable influence on various lipid profile parameters [3]. In addition, oleic acid, as the main fatty acid in all categories of olive oil (EVOO, VOO, OO, and OPO), allows these oils to be classified as monounsaturated fats with the potential to reduce coronary heart disease risk, as had already been recognized by the FDA (Food and Drug Administration 2004) [31]. In this regard, a systematic review and meta-analysis developed by Pastor et al. [32] to assess the effect of hydroxytyrosol, oleic acid, or a combination of both (olive oil) on metabolic syndrome revealed that oleic acid consumption had a beneficial effect on lipid profile. Therefore, the slight downward trend observed in serum levels of TC (in both groups), and TG, LDL-C, and VLDL-C in healthy subjects after OPO intake (Table 4), yet not reaching significant differences, could be a consequence of consuming this monounsaturated fat (OPO) rich in bioactive compounds. In relation to SO, its effect on the lipid profile was investigated in 200 patients with heart disease, where consumption of SO versus coconut oil (a source of saturated fat) showed no significant differences in lipid profile markers (TC, LDL-C, HDL-C, VLDL, Apo B/Apo A ratio) [33], in agreement with the results obtained in the present study. As shown in Table 4, the intervention with SO also resulted in slight, non-significant decreases in TG and VLDL levels in healthy subjects and a reduction in TC in the risk group. This downward trend may be related to the high linoleic acid content of SO, since consumption of this PUFA has been associated with reduced CVD mortality [34].

On the other hand, the mean values of ASAT and ALAT enzymes did not show variations in both groups (normocholesterolemic and hypercholesterolemic) after OPO and SO intake (Table 4). This result was to be expected considering that an increase in the concentration and/or activity of these enzymes is related to adverse events [35], which were not observed in any volunteers. Moreover, blood pressure not only remained within the normal range in all volunteers (with values between 130 and 80 mmHg for SBP and DBP, respectively) [36], but also throughout the study after the OPO and SO dietary intervention (Supplementary Table S1). Several animal studies conducted to evaluate the effect of triterpenic acids (specifically oleanolic acid) on endothelial function demonstrated a protective action against blood pressure dysregulation and disorders associated with hypertension [14,37]. However, considering that participants in the present study were not hypertensive, the lack of effect on blood pressure could be due to being normotensive.

Similarly, markers of endothelial function did not show significant changes after the dietary intervention with OPO and SO. Only eNOS was close to reaching the significance level for the effect of oil ( $p = 0.083$ ), with a downward and upward trend after OPO and SO consumption, respectively (Table 6). This enzyme is responsible for the synthesis of nitric oxide (NO), a key element in vasodilation and the maintenance of vascular tone [38]. Therefore, this result reinforces the possible beneficial effect of OPO on endothelial function previously observed in hypertensive animals fed OPO enriched in triterpenic acids (oleanolic acid and maslinic acid) [13,38]. The slight non-significant decrease detected after SO consumption could be related to its high content in linoleic acid, based on a study in endothelial progenitor cells (EPCs) in which incubation with linoleic acid (the main fatty acid in SO) caused a reduction in eNOS expression [39].

#### 4.3. Effect of Nutritional Intervention on Inflammation Markers

Given the relationship between cardiovascular risk and inflammatory processes, different biomarkers of inflammation were analysed. According to the linear mixed model applied to the rates of change, OPO resulted in a slight increase in serum levels of the anti-inflammatory cytokines IL-4 ( $p = 0.021$ ) and IL-13 ( $p = 0.023$ ) concentrations, showing a decrease after SO consumption in both normo- and hypercholesterolemic humans (Table 5). IL-4 acts as an anti-inflammatory cytokine by blocking the synthesis of IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, and macrophage inflammatory protein [40]. It also promotes Th2 lymphocyte differentiation, B-lymphocyte proliferation and differentiation, and is a potent inhibitor of apoptosis [40,41]. The anti-inflammatory cytokine IL-13 modulates the production of IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, and macrophage inflammatory protein. In addition, IL-13 stimulates B cell growth and differentiation, inhibits Th1 cells and the production of inflammatory cytokines [42]. IL-4 and IL-13 have been studied for their involvement in the pathogenesis of allergic disorders such as asthma [40,41] and atopic dermatitis [42] through the activation of eosinophils and the production of immunoglobulin E (IgE) by B cells [43]. Although the assessed inflammation parameters showed significant differences in IL-4 and IL-13, their association with allergic disorders such as asthma suggests that these changes could be driven by factors external to the dietary intervention.

The behaviour of some minor components of OPO, such as squalene [43] or triterpenic acids (ursolic and oleanolic acids) [44,45] on the inflammatory response has already been evaluated *in vitro* and in animal models. The slight upward trend of IL-4 and IL-13 after OPO intake agrees with that observed in a study by Sánchez-Quesada et al. [43] after treatment with 1  $\mu$ M squalene of immune cells differentiated into pro-inflammatory M1 macrophages. In contrast, studies carried out in murine models with ursolic acid [45,46] and oleanolic acid [44] have shown a reduction in IL-4 [46] and IL-13 [44–46] levels. The relationship between consumption of OPO enriched with triterpenic acids (maslinic and oleanolic acids) and the production of inflammatory mediators has been evaluated in several studies in murine animals [13,14]. In these studies, a lower expression of TNF- $\alpha$  and MCP-1 was found when the animals were fed with OPO enriched with oleanolic and maslinic acids. In the study (Table 5), TNF- $\alpha$  value showed minimal variation after OPO ingestion. However, these results cannot be compared with those obtained in the present trial because they were performed in cultured M1 macrophages [43] or in murine models with asthma [44–46], in contrast to our study, where participants did not have a baseline inflammatory state.

The slight decrease observed in IL-4 after SO intake was also observed in a clinical trial conducted in 78 patients after administration of 2.5 g/day of conjugated linoleic acid (CLA), 400 mg/day of vitamin E, or their mixture in adults with rheumatoid arthritis [47]. All other parameters analysed did not reach the level of significance (Table 5). However, in line with Claro-Cala et al. [14], MCP-1 values showed a slight decreasing trend in both groups of volunteers after OPO ingestion without reaching the level of significance. As mentioned above, more nutritional intervention studies with OPO are required to determine if the findings of this study are replicated in other trials.

#### 4.4. Effect of Nutritional Intervention on Diabetes and Obesity Markers

Regarding the effect of OPO and SO consumption on parameters associated with insulin resistance and glycaemic homeostasis, Table 7 shows that mean values of glucose, insulin and HbA1c remained within the normal range for the adult population [48]. This outcome was expected as participants did not suffer from type 2 diabetes mellitus and suggests the lack of insulin resistance in the study population. However, significant changes were observed in HbA1c ( $p = 0.021$ ) by group effect (normocholesterolemic and hypercholesterolemic group), and in glucose values by dietary intervention effect (OPO and SO) ( $p = 0.007$ ) (Table 7). According to the Bonferroni test, changes in glucose values ( $p = 0.007$ ) were observed in normocholesterolemic subjects, with a slight increase of 1.3% after OPO intake, and a decrease of 2.6% after SO intake (Table 7). This tendency was contrary to that in hypercholesterolemic subjects, with a slight decrease of 0.3% after OPO intake and an increase of 3.1% after SO intake. However, considering that glucose levels in volunteers of both groups were within the normal range for the adult population (70 and 130 mg/dL) [48], these small changes would likely have minor physiological relevance. The effect of SO on blood glucose levels has been assessed in a recent clinical trial where consumption of 25 mL/day of SO for seven weeks showed no changes in this marker of diabetes [49]. Similarly, a clinical trial conducted with conjugated linoleic acid (3.9 g/day) versus high oleic sunflower oil (3.9 g/day) in 62 healthy subjects for 12 weeks showed no changes in glucose concentrations [50].

The effect of OPO intake on glucose levels has also been evaluated in obese rats after administration of OPO enriched in oleanolic and maslinic acids. The results demonstrated improved oral glucose tolerance compared to obese control mice [14]. Oleanolic acid, which is substantially more abundant in OPO (187 mg/kg) than in SO (<2 mg/kg), has been shown to exert a beneficial effect on glucose metabolism after administration of 55 mL/day of oleanolic acid-enriched olive oil in a clinical trial in 176 pre-diabetic subjects [51]. In addition, animal studies have evaluated the effect of consuming oleanolic acid, either 10 mg/kg daily [52] or 80 mg/kg every three days [53]. The results supported the hypoglycaemic role of this compound by demonstrating a decrease in blood glucose levels [52,53]. Another characteristic component of the triterpene fraction of OPO, ursolic acid, has also shown antidiabetic activity by reducing blood glucose levels and improving glucose tolerance [54]. These results show that OPO rich in triterpenic compounds could positively contribute to glucose metabolism, and more clinical trials in hyperglycaemic volunteers consuming OPO daily are needed to understand the effect of this type of oil.

Finally, the calculation of mathematical equations to measure insulin resistance (HOMA-IR) ( $p = 0.020$ ) and insulin sensitivity (QUICKI index) ( $p = 0.011$ ) showed statistically significant differences between the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups in agreement with the mentioned results of glucose and insulin (Table 7).

Among the obesity-related markers, ghrelin ( $p = 0.031$ ) and leptin ( $p = 0.017$ ), known for their role in appetite regulation, showed significant changes due to the study oils effect (Table 8). The orexigenic hormone ghrelin increased in both groups after dietary intervention with OPO and SO, the increase being more pronounced after SO intake (18.6%) in the risk group. As for the anorexigenic hormone leptin, except for an 8.0% decrease in the normocholesterolemic group after OPO intake, this hormone increased subsequently after intervention with OPO (in the risk group) and SO in both groups of volunteers (Table 8). Studies in obese mice after administration of oleanolic acid (10 mg/kg) and ursolic acid (50 mg/L, in the drinking water) revealed a decrease in ghrelin levels [52,55], contrary to that observed in the present trial after OPO intervention. In relation to leptin, results reported in the literature are contradictory. De Melo et al. [52] and Rao et al. [55] observed an increase in plasma levels of this hormone in mice treated with oleanolic and ursolic acids. In contrast, a study developed by Jia et al. [54] showed decreased levels of leptin after oral administration of ursolic acid (50 and 200 mg/kg), in line with what we observed in healthy volunteers after OPO administration. However, the amount of triterpenic compounds provided by OPO in the present study (equivalent to 8.4 mg/day of oleanolic

acid and trace amounts of ursolic acid) is significantly lower than those administered in the aforementioned studies, which would justify the results of the present clinical study.

#### 4.5. Effect of Nutritional Intervention on Anthropometric Measurements

One of the most remarkable results associated with OPO and SO consumption was observed in visceral fat ( $p = 0.028$ ), a marker of cardiovascular and metabolic risk. According to Table 9, OPO consumption produced a slight decrease of 4.5% and 1.4% in both groups of volunteers (healthy and at-risk groups), and an increase after SO intake of 2.2% and 6.6% in the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups, respectively. The beneficial effect on anthropometric parameters following consumption of a monounsaturated fat was also observed in an intervention study, where consumption of up to 20 g/day of olive oil for 6 months led to a significant decrease in body weight and BMI [56]. Similarly, administration of oleanolic acid [52] or ursolic acid [55] to obese mice, as well as with OPO enriched in triterpenic acids (oleanolic and maslinic acids) [14], showed not only a decrease in body weight but also a decrease in visceral adiposity. Given that visceral obesity is associated with increased adipocytokine production, pro-inflammatory activity, increased risk of developing diabetes, dyslipidaemia, hypertension, and atherosclerosis [57], this finding supports the idea that OPO consumption could be a nutritional tool to prevent the onset of cardiometabolic diseases. The upward trend observed in the present study following the intake of SO is consistent with the study in which SO and its effect on visceral fat accumulation was evaluated in humans (39 subjects). The study involved overfeeding with PUFA-rich muffins, which showed a lower increase in visceral fat compared with subjects fed saturated fat-rich muffins [58]. Finally, BMI was statistically significantly different between the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups, with higher mean levels in participants with elevated cholesterol levels, supporting the association between altered lipid profile levels (such as high TC levels) and elevated indicators of overweight/obesity. However, no differences were observed due to the consumption of both oils studied (Table 9).

#### 4.6. Effect of Nutritional Intervention on Oxidative Status

Three complementary methods such as FRAP, ABTS, and ORAC were applied to determine the antioxidant capacity after nutritional intervention with OPO and SO. According to the linear repeated measures model, consumption of OPO and SO had no effect on any of the parameters used to evaluate the oxidative status of the volunteers (Supplementary Table S2). Significant differences in FRAP values were only observed for the effect of belonging to the normocholesterolemic or hypercholesterolemic group ( $p = 0.013$ ). Another marker assessed for oxidative status after OPO and SO consumption was LDLox. Oxidation of this lipoprotein, which plays an important role in the initiation and progression of atherosclerosis, also showed no significant variations throughout the trial (Supplementary Table S2). This parameter has been evaluated in different *in vitro* assays, carried out with different compounds present in OPO, such as erythrodiol, uvaol, oleanolic acid, and maslinic acid, with positive results in the reduction of lipid peroxidation [3]. Furthermore, a diet supplemented with a by-product rich in squalene resulted in lower serum LDLox levels in postmenopausal women [59]. In the present study, a slight decrease of  $-10.0\%$  (Supplementary Table S2) in LDLox concentrations was observed after OPO intervention in at-risk subjects, although without reaching significant differences. These results are in line with those described by Conterno et al. [60] in hypercholesterolemic subjects, where the 8-week consumption of olive pomace powder-enriched cookies tended to reduce LDLox levels, again without reaching the level of significance. These results evidence the interest in conducting further clinical trials with OPO in subjects with high cholesterol levels to confirm the potential effect on LDLox.

On the other hand, the consumption of both vegetable oils (OPO and SO) had no significant effect on serum MDA levels, a widely used marker of lipid peroxidation, in both study groups (Supplementary Table S2). There are previous studies demonstrating how triterpenic acids (oleanolic, ursolic, and maslinic acids) [61–64] and squalene (components of OPO) [65] decrease MDA levels in various animal models of hypertension, inflammation, or diabetes. However, the high, pharmacological dose of pure triterpenic acids and squalene administered to the experimental animals, as well as the pathologies of the murine models used, limit potential comparisons with the present nutritional human intervention study.

Finally, it is important to note that both oils evaluated in this study (OPO and SO) are foods with a high vitamin E content, a nutrient that has been shown to contribute to the protection of cells against oxidative damage (Commission Regulation (EC) No. 432/2012) [66]. Due to the similarity in the vitamin E content in OPO and SO (Table 1), it is possible that no differences were observed in the oxidative status parameters evaluated.

#### 4.7. Strengths and Limitations

One of the strengths of this novel clinical trial carried out with OPO was the identification of numerous biomarkers related to cardiovascular disease and its associated pathologies. This approach provides a broad understanding of the role of OPO on health in humans. However, the present study also had limitations on the blinding of volunteers, considering that the colour, smell, and taste of the two oils are different, it was not possible to prevent volunteers (familiar with both oils) from knowing/guessing which oil they were consuming in each stage. Another limitation was that the results reported in the present trial do not allow the generation of clinical evidence because the type I error of 0.05 and statistical power of 80% (1-beta) were taken as a reference in an incidental sample of volunteers controlled only by cholesterol levels. To generate clinical evidence, it would have been necessary to adjust (reduce) alpha and to perform the present study in a population with many other controllable effects (in addition to cholesterol levels).

## 5. Conclusions

Regular consumption of OPO and SO had no statistically significant effect on any of the markers related to lipid profile, blood pressure, and endothelial function in normocholesterolemic and hypercholesterolemic participants. Only eNOS level change was close to being significant due to the effect of oil (OPO and SO) ( $p = 0.083$ ); further studies would be necessary to assess the potential effect of OPO on this biomarker, of great interest considering the involvement of eNOS on the synthesis of nitric oxide, the main factor responsible for vasodilation and maintenance of vascular tone. This result was reinforced by a significant decrease in visceral fat ( $p = 0.028$ ) after OPO intake in both groups, accompanied by the increment of leptin level in the hypercholesterolemic group ( $p = 0.017$ ). These results suggest a potential beneficial effect of sustained consumption of OPO on biomarkers that may have a positive effect on cardiometabolic health. However, more clinical trials on at-risk populations are needed to confirm these health effects.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14193927/s1>, Table S1: Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on blood; Table S2: Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on antioxidant capacity and lipid peroxidation.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.B.-C., R.M. and B.S.; methodology, B.S., R.M., S.G.-R., M.Á.S. and J.G.-C.; software, S.G.-R., M.Á.S. and J.G.-C.; validation, R.M.; analysis, S.G.-R., M.Á.S. and J.G.-C.; investigation, R.M., B.S. and L.B.-C.; resources, R.M., B.S. and L.B.-C.; data curation, S.G.-R. and M.Á.S.; writing—original draft preparation, S.G.-R. and R.M.; writing—review and editing, R.M., B.S. and L.B.-C.; supervision, R.M. and B.S.; project administration, L.B.-C., R.M. and B.S.; funding acquisition R.M. and L.B.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Interprofesional del Aceite de Orujo de Oliva (ORIVA) financed the study (Ref. 20193239) and the predoctoral contract of S.G.R. (Ref. 20184930). The Community of Madrid partly financed the predoctoral contracts of M.A.S. (PEJD-2018-PRE/SAL-9104) and J.G.-C. (PEJD-2017-PRE/BIO-4225). No other conflicts of interests are declared. ORIVA had no part on the design, conductance, analysis, or interpretation of results.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda (protocol code PI 110/19 date of approval 22 July 2019) and the Bioethics Committee of CSIC.

**Informed Consent Statement:** The study was approved by the Bioethics Committee of Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta del Hierro (protocol code PI 110/19, date of approval 22 July 2019). It was retrospectively registered in ClinicalTrials.gov (NCT04998695). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy concerns.

**Acknowledgments:** We are grateful to volunteers for their participation in the study and to Laura Barrios for her statistical advice.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

BMI: body mass index; CLA: conjugated linoleic acid; CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; CO: corn oil; DBP: diastolic blood pressure; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; EPCs: endothelial progenitor cells; (ESC) European society of cardiology; EVOO: extra virgin olive oil; FRAP: ferric reducing/antioxidant power; GLP-1: glucagon-like peptide type 1; HbA1c: glycosylated haemoglobin; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte monocyte colony-stimulating factor; HPLC: high-performance liquid chromatography; HOMA-IR: homeostatic model to assess  $\beta$ -cell functionality; HOMA-IR: homeostatic model to assessment insulin resistance; IgE: immunoglobulin E; GIP: incretin gastric inhibitory polypeptide; ICTAN: institute of food science, technology and nutrition; ICAM-1: intercellular adhesion molecules; IFN- $\gamma$ : interferon-gamma; IL: interleukins; LDL-C: low density lipoprotein; LDL-ox: low density lipoprotein oxidation; MIP-1 $\beta$ : macrophage inflammatory protein 1 beta; MDA: malondialdehyde; MD: Mediterranean diet; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; MUFA: monounsaturated fatty acids; NO: nitric oxide; OO: olive oil; OPO: olive pomace oil; ORAC: oxygen radical absorbance capacity; PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; PUFA: polyunsaturated fatty acid; SO: sunflower oil; SBP: systolic blood pressure; TC: total cholesterol; TRL: triglyceride-rich lipoproteins (TRL); TG: triglycerides; TNF- $\alpha$ : tumour necrosis factor alpha; VCAM-1: vascular adhesion molecules; VOO: virgin olive oil; VLDL: very low-density lipoprotein.

## References

1. D’Innocenzo, S.; Biagi, C.; Lanari, M. Obesity and the Mediterranean Diet: A review of evidence of the role and sustainability of the Mediterranean Diet. *Nutrients* **2019**, *11*, 1306. [CrossRef]
2. Martínez-González, M.A.; Salas-Salvadó, J.; Estruch, R.; Corella, D.; Fitó, M.; Ros, E.; PREDIMED investigators. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED study. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2015**, *58*, 50–60. [CrossRef] [PubMed]
3. Mateos, R.; Sarriá, B.; Bravo, L. Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 3506–3521. [CrossRef]
4. Marcelino, G.; Hiane, P.A.; Freitas, K.C.; Santana, L.F.; Pott, A.; Donadon, J.R.; Guimarães, R. Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota. *Nutrients* **2019**, *11*, 1826. [CrossRef]
5. Mazzocchi, A.; Leone, L.; Agostoni, C.; Pali-Schöll, I. The secrets of the Mediterranean Diet. Does [only] olive oil matter? *Nutrients* **2019**, *11*, 2941. [CrossRef] [PubMed]
6. ANIERAC: Asociación Nacional de Industriales Envasadores y Refinadores de Aceites Comestibles. Available online: <https://anierac.org/consumo-en-espana/?lang=es> (accessed on 1 January 2022).

7. García-Aloy, M.; Hulshof, P.J.M.; Estruel-Amades, S.; Osté, M.C.J.; Lankinen, M.; Geleijnse, J.M.; de Goede, J.; Ulaszewska, M.; Mattivi, F.; Bakker, S.J.L.; et al. Biomarkers of food intake for nuts and vegetable oils: An extensive literature search. *Genes Nutr.* **2019**, *14*, 7. [CrossRef] [PubMed]
8. Aceites de Semillas: Palma, Colza, Soja y Girasol Lideran la Producción y el Consumo Mundial. Available online: [https://www.mercasa.es/media/publicaciones/58/pag\\_065-070\\_Murcia.pdf](https://www.mercasa.es/media/publicaciones/58/pag_065-070_Murcia.pdf) (accessed on 2 February 2022).
9. Ruiz-Méndez, M.V.; Márquez-Ruiz, G.; Holgado, F.; Velasco, J. Stability of bioactive compounds in olive-pomace oil at frying temperature and incorporation into fried foods. *Foods* **2021**, *10*, 2906. [CrossRef]
10. Olimerca. Available online: <https://www.olimerca.com/precios/tipoInforme/1> (accessed on 2 February 2022).
11. Sánchez-Moral, P.; Ruiz-Méndez, M.V. Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites* **2006**, *57*, 47–55. [CrossRef]
12. Lee, W.; Yang, E.J.; Ku, S.K.; Song, K.S.; Bae, J.S. Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Inflammation* **2013**, *36*, 94–102. [CrossRef]
13. Valero-Muñoz, M.; Martín-Fernández, B.; Ballesteros, S.; de la Fuente, E.; Quintela, J.C.; Lahera, V.; de las Heras, N. Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: Mechanisms involved. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 376–383. [CrossRef]
14. Claro-Cala, C.M.; Quintela, J.C.; Pérez-Montero, M.; Miñano, J.; de Sotomayor, M.A.; Herrera, M.D.; Rodríguez-Rodríguez, A.R. Pomace olive oil concentrated in triterpenic acids restores vascular function, glucose tolerance and obesity progression in mice. *Nutrients* **2020**, *12*, 323. [CrossRef] [PubMed]
15. Cabello-Moruno, R.; Martínez-Force, E.; Montero, E.; Perona, J.S. Minor components of olive oil facilitate the triglyceride clearance from postprandial lipoproteins in a polarity-dependent manner in healthy men. *Nutr. Res.* **2014**, *34*, 40–47. [CrossRef] [PubMed]
16. González-Rámila, S.; Sarriá, B.; Seguido, M.A.; García-Cordero, J.; Mateos, R.; Bravo, L. Olive pomace oil can improve blood lipid profile: A randomized, blind, crossover, controlled clinical trial in healthy and at-risk volunteers. *Eur. J. Nutr.* **2022**, *in press*.
17. González-Rámila, S.; Mateos, R.; García-Cordero, J.; Seguido, M.A.; Bravo-Clemente, L.; Sarriá, B. Olive pomace oil versus high oleic sunflower oil and sunflower oil: A comparative study in healthy and cardiovascular risk humans. *Foods* **2022**, *11*, 2186. [CrossRef] [PubMed]
18. Pérez-Camino, M.C.; Cert, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1558–1562. [CrossRef]
19. Giacometti, J. Determination of aliphatic alcohols, squalene, alpha-tocopherol and sterols in olive oils: Direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst* **2001**, *126*, 472–475. [CrossRef]
20. Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Ríos, J.J.; León-Camacho, M.; Alcudia, F.; Cert, A. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2185–2192. [CrossRef]
21. Manual de Nutrición y Dietética. Available online: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/22755/1/Manual-nutricion-dietetica-CARBAJAL.pdf> (accessed on 20 January 2022).
22. Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419. [CrossRef]
23. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [CrossRef]
24. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Prior, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *50*, 4437–4444. [CrossRef]
25. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [CrossRef]
26. Mateos, R.; Lecumberri, E.; Ramos, S.; Goya, L.; Bravo, L. Determination of malondialdehyde (mda) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J. Chromatogr. B* **2005**, *827*, 76–82.
27. Martínez-López, S.; Sarriá, B.; Mateos, R.; Bravo-Clemente, L. Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: Results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 865–878. [CrossRef] [PubMed]
28. Moreiras, O.; Carbajal, A.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española. In *Tabla de Composición de Alimentos*, 18th ed.; Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C., Eds.; Ediciones Pirámides (Grupo Anaya, SA): Madrid, Spain, 2016; pp. 127–131.
29. Holgado, F.; Ruiz-Méndez, M.V.; Velasco, J.; Márquez-Ruiz, G. Performance of olive-pomace oils in discontinuous and continuous frying. Comparative behavior with sunflower oils and high-oleic sunflower oils. *Foods* **2021**, *10*, 3081. [CrossRef]
30. Güneşer, B.A.; Yılmaz, E.; Ok, S. Cold pressed versus refined winterized corn oils: Quality, composition and aroma. *Grasas y Aceites* **2017**, *68*, e194. [CrossRef]
31. Food and Drugs Administration (FDA). Available online: <https://www.fda.gov/> (accessed on 9 June 2022).
32. Pastor, R.; Bouzas, C.; Tur, J.A. Beneficial effects of dietary supplementation with olive oil, oleic acid, or hydroxytyrosol in metabolic syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *172*, 372–385. [CrossRef]

33. Vijayakumar, M.; Vasudevan, D.M.; Sundaram, K.R.; Krishnan, S.; Vaidyanathan, K.; Nandakumar, S.; Chandrasekhar, R.; Mathew, N. A randomized study of coconut oil versus sunflower oil on cardiovascular risk factors in patients with stable coronary heart disease. *Indian Heart J.* **2016**, *68*, 498–506. [[CrossRef](#)]
34. Jandacek, R.J. Linoleic acid: A nutritional quandary. *Healthcare* **2017**, *5*, 25. [[CrossRef](#)]
35. Weiß, J.; Rau, M.; Geier, A. Non-alcoholic fatty liver disease: Epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2014**, *111*, 447–452.
36. de la Sierra, A. New American and European hypertension guidelines, reconciling the differences. *Cardiol. Ther.* **2019**, *8*, 157–166. [[CrossRef](#)]
37. Rodríguez-Rodríguez, R. Oleoic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1414–1425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rodríguez-Rodríguez, R.; Herrera, M.D.; de Sotomayor, M.A.; Ruiz-Gutiérrez, V. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. J. Hypertens.* **2007**, *20*, 728–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Guo, W.X.; Yang, Q.D.; Liu, Y.H.; Xie, X.Y.; Wang, M.; Niu, R.C. Palmitic and linoleic acids impair endothelial progenitor cells by inhibition of Akt/eNOS pathway. *Arch. Med. Res.* **2008**, *39*, 434–442. [[CrossRef](#)]
40. Junttila, I.S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Gour, N.; Wills-Karp, M. IL-4 and IL-13 signalling in allergic airway disease. *Cytokine* **2015**, *75*, 68–78. [[CrossRef](#)]
42. Gonçalves, F.; Freitas, E.; Torres, T. Selective IL-13 inhibitors for the treatment of atopic dermatitis. *Drugs Context* **2021**, *10*, 2021-1-7. [[CrossRef](#)]
43. Sánchez-Quesada, C.; López-Biedma, A.; Toledo, E.; Gaforio, J.J. Squalene stimulates a key innate immune cell to foster wound healing and tissue repair. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2018**, *2018*, 9473094. [[CrossRef](#)]
44. Kim, S.H.; Hong, J.H.; Lee, Y.C. Oleoic acid suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Th2-mediated allergic asthma by modulating the transcription factors T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t and Foxp3 in asthmatic mice. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *18*, 311–324. [[CrossRef](#)]
45. Kim, S.H.; Hong, J.H.; Lee, Y.C. Ursolic acid, a potential PPAR $\gamma$  agonist, suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *701*, 131–143. [[CrossRef](#)]
46. Sun, N.; Han, Z.; Wang, H.; Guo, Z.; Deng, C.; Dong, W.; Zhuang, G.; Zhang, R. Effects of ursolic acid on the expression of Th1-Th2-related cytokines in a rat model of allergic rhinitis after PM2.5 exposure. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2020**, *34*, 587–596. [[CrossRef](#)]
47. Aryaeian, N.; Djalali, M.; Shahram, F.; Djazayeri, A.; Eshragian, M.R. Effect of conjugated linoleic acid, vitamin E, alone or combined on immunity and inflammatory parameters in adults with active rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial. *Int. J. Prev. Med.* **2014**, *5*, 1567–1577. [[PubMed](#)]
48. Nathan, D.M.; Buse, J.B.; Davidson, M.B.; Ferrannini, E.; Holman, R.R.; Sherwin, R.; Zinman, B.; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* **2009**, *52*, 17–30. [[CrossRef](#)]
49. Akrami, A.; Nikaein, F.; Babajafari, S.; Faghhi, S.; Yarmohammadi, H. Comparison of the effects of flaxseed oil and sunflower seed oil consumption on serum glucose, lipid profile, blood pressure, and lipid peroxidation in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Lipidol.* **2018**, *12*, 70–77. [[CrossRef](#)]
50. Lambert, E.V.; Goedecke, J.H.; Bluett, K.; Heggie, K.; Claassen, A.; Rae, D.E.; West, S.; Dugas, J.; Dugas, L.; Meltzer, S.; et al. Conjugated linoleic acid versus high-oleic acid sunflower oil: Effects on energy metabolism, glucose tolerance, blood lipids, appetite and body composition in regularly exercising individuals. *Br. J. Nutr.* **2007**, *97*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
51. Santos-Lozano, J.M.; Rada, M.; Lapetra, J.; Guinda, Á.; Jiménez-Rodríguez, M.C.; Cayuela, J.A.; Ángel-Lugo, A.; Vilches-Arenas, Á.; Gómez-Martín, A.M.; Ortega-Calvo, M.; et al. Prevention of type 2 diabetes in prediabetic patients by using functional olive oil enriched in oleoic acid: The PREDIABOLE study, a randomized controlled trial. *Diabetes Obes. Metab.* **2019**, *21*, 2526–2534. [[CrossRef](#)]
52. de Melo, C.L.; Queiroz, M.G.; Fonseca, S.G.; Bizerra, A.M.; Lemos, T.L.; Melo, T.S.; Santos, F.A.; Rao, V.S. Oleoic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *185*, 59–65. [[CrossRef](#)]
53. Gamede, M.; Mabuza, L.; Ngubane, P.; Khathi, A. The effects of plant-derived oleoic acid on selected parameters of glucose homeostasis in a diet-induced pre-diabetic rat model. *Molecules* **2018**, *23*, 794. [[CrossRef](#)]
54. Jia, Y.; Kim, S.; Kim, J.; Kim, B.; Wu, C.; Lee, J.H.; Jun, H.J.; Kim, N.; Lee, D.; Lee, S.J. Ursolic acid improves lipid and glucose metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hepatic autophagy. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 344–354. [[CrossRef](#)]
55. Rao, V.S.; de Melo, C.L.; Queiroz, M.G.; Lemos, T.L.; Menezes, D.B.; Melo, T.S.; Santos, F.A. Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from *Sambucus australis*, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet. *J. Med. Food.* **2011**, *14*, 1375–1382. [[CrossRef](#)]

56. Nigam, P.; Bhatt, S.; Misra, A.; Chadha, D.S.; Vaidya, M.; Dasgupta, J.; Pasha, Q.M. Effect of a 6-month intervention with cooking oils containing a high concentration of monounsaturated fatty acids (olive and canola oils) compared with control oil in male Asian Indians with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Technol. Ther.* **2014**, *16*, 255–261. [[CrossRef](#)]
57. Amato, M.C.; Giordano, C.; Galia, M.; Criscimanna, A.; Vitabile, S.; Midiri, M.; Galluzzo, A.; AlkaMeSy Study Group. Visceral adiposity index: A reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* **2010**, *33*, 920–922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Rosqvist, F.; Iggman, D.; Kullberg, J.; Cedernaes, J.; Johansson, H.E.; Larsson, A.; Johansson, L.; Ahlström, H.; Arner, P.; Dahlman, I.; et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes* **2014**, *63*, 2356–2368. [[CrossRef](#)]
59. Casado-Díaz, A.; Túnez-Fiñana, I.; Mata-Granados, J.M.; Ruiz-Méndez, M.V.; Dorado, G.; Romero-Sánchez, M.C.; Navarro-Valverde, C.; Quesada-Gómez, J.M. Serum from postmenopausal women treated with a by-product of olive-oil extraction process stimulates osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis in human mesenchymal stem-cells (MSC). *Exp. Gerontol.* **2017**, *90*, 71–78. [[CrossRef](#)]
60. Conterno, L.; Martinelli, F.; Tamburini, M.; Fava, F.; Mancini, A.; Sordo, M.; Pindo, M.; Martens, S.; Masuero, D.; Vrhovsek, U.; et al. Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 63–81. [[CrossRef](#)]
61. Iskender, H.; Dokumacioglu, E.; Terim Kapakin, K.A.; Yenice, G.; Mohtare, B.; Bolat, I.; Hayirli, A. Effects of oleanolic acid on inflammation and metabolism in diabetic rats. *Biotech. Histochem.* **2021**, *97*, 269–276. [[CrossRef](#)]
62. Madlala, H.P.; Van Heerden, F.R.; Mubagwa, K.; Musabayane, C.T. Changes in renal function and oxidative status associated with the hypotensive effects of oleanolic acid and related synthetic derivatives in experimental animals. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128192. [[CrossRef](#)]
63. Liu, B.; Piao, X.; Guo, L.; Liu, S.; Chai, F.; Gao, L. Ursolic acid protects against ulcerative colitis via anti-inflammatory and antioxidant effects in mice. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 4779–4785. [[CrossRef](#)]
64. Mkhwanazi, B.N.; Serumula, M.R.; Myburg, R.B.; Van Heerden, F.R.; Musabayane, C.T. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: Effects on kidney function. *Ren. Fail.* **2014**, *36*, 419–431. [[CrossRef](#)]
65. Chen, Y.; Gu, Y.; Zhao, H.; Zhang, H.; Zhou, Y. Effects of graded levels of dietary squalene supplementation on the growth performance, plasma biochemical parameters, antioxidant capacity, and meat quality in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 5915–5924. [[CrossRef](#)]
66. European Commission. Commission Regulation (EC) No 432/2012. *Off. J. Eur. Union* **2012**, *L136*, 1–40.

## SUPPLEMENTARY TABLES

**Table S1.** Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on blood pressure.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H* Oil
Systolic BP (mmHg)							
Initial	110 ± 2	111 ± 2	119 ± 3	119 ± 2	0.948	0.001	0.729
Final	110 ± 2	110 ± 2	119 ± 2	118 ± 2	0.984	0.000	0.811
Rate of change	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.919	0.903	0.980
Diastolic BP (mmHg)							
Initial	73 ± 2	74 ± 2	80 ± 1	79 ± 2	0.853	0.000	0.821
Final	71 ± 2	73 ± 2	79 ± 1	78 ± 1	0.628	0.000	0.288
Rate of change	-3.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	-1.00 ± 0.01	0.165	0.360	0.136

Values represent mean ± SEM. The table shows the initial (pre-treatment) and final (post-treatment) mean values. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value] and expressed as percentage. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (olive pomace oil -OPO- or sunflower oil -SO-), those of the penultimate column to the effect of the group (normocholesterolemic or hypercholesterolemic), and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p*<0.05. BP: Blood pressure.

**Table S2.** Effect of olive pomace oil (OPO) and sunflower oil (SO) consumption on endothelial function biomarkers.

	Normocholesterolemic <i>n</i> = 31		Hypercholesterolemic <i>n</i> = 37		<i>p</i> value		
	OPO	SO	OPO	SO	Oil	N/H	N/H* Oil
<b>eNOS (ng/mL)</b>							
Initial	0.21 ± 0.03	0.25 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.926	0.647	0.597
Final	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.944	0.708	0.644
Rate of change	16.03 ± 0.14	-6.67 ± 0.09	15.98 ± 0.14	-4.76 ± 0.12	0.083	0.903	0.912
<b>E-selectin (ng/mL)</b>							
Initial	11 ± 2	15 ± 2	12 ± 2	13 ± 2	0.260	0.939	0.540
Final	11 ± 2	14 ± 3	11 ± 2	10 ± 1	0.588	0.193	0.045
Rate of change	18.0 ± 0.1	14.4 ± 0.1	5.4 ± 0.1	16.5 ± 0.2	0.552	0.342	0.960
<b>P-selectin (ng/mL)</b>							
Initial	214 ± 18	190 ± 12	195 ± 11	195 ± 11	0.412	0.537	0.469
Final	206 ± 15	202 ± 16	179 ± 12	196 ± 11	0.635	0.226	0.448
Rate of change	0.60 ± 0.05	6.86 ± 0.05	-1.72 ± 0.06	2.85 ± 0.04	0.289	0.519	0.871
<b>ICAM-1 (pg/mL)</b>							
Initial	3093 ± 495	3332 ± 502	2954 ± 439	3291 ± 579	0.546	0.854	0.553
Final	2900 ± 452	3302 ± 566	3270 ± 557	3311 ± 643	0.705	0.770	0.601
Rate of change	-0.09 ± 0.05	-1.84 ± 0.04	9.30 ± 0.06	-1.88 ± 0.05	0.120	0.742	0.473
<b>VCAM-1 (pg/mL)</b>							
Initial	11049 ± 2375	11961 ± 2422	10716 ± 2081	12911 ± 2894	0.426	0.909	0.822
Final	11280 ± 2523	13101 ± 3152	12271 ± 2480	13917 ± 3574	0.522	0.822	0.621
Rate of change	5.44 ± 0.07	10.51 ± 0.08	19.90 ± 0.08	6.11 ± 0.09	0.373	0.856	0.073

Values represent mean ± SEM. The rate of change was calculated from initial and final values as [(final value-initial value)/initial value]. Data were analyzed using a linear mixed model. *p* values in the first column correspond to the effect of taking the oil (olive pomace oil -OPO- or sunflower oil -SO-), those of the penultimate column correspond to the effect of the group (normocholesterolemic or hypercholesterolemic), and the last column to the interaction of oil and group. Significance level was set at *p*<0.05. eNOS: Endothelial nitric oxide synthase. E-selectin: Endothelial selectin. P-selectin: Platelet selectin. ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1. VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1.

## 2.3. Resultados no publicados

### 2.3.1. Grado de aceptación del aceite de orujo de oliva y del aceite de girasol.

En la última visita del estudio, como se realizó en el primer ensayo, cuando todos los participantes habían completado ambas intervenciones dietéticas (con el AOO y AG), los voluntarios completaron un cuestionario para determinar su grado de satisfacción de con ambos aceites. De acuerdo a la Figura 20, el sabor, olor y color del AOO obtuvo una mejor puntuación en comparación con el AG. Del mismo modo, cuando se pidió que valorasen ambos aceites desde el punto de vista culinario, el AOO recibió una mejor valoración cuando se aplicaba en crudo, fritura u otras técnicas.

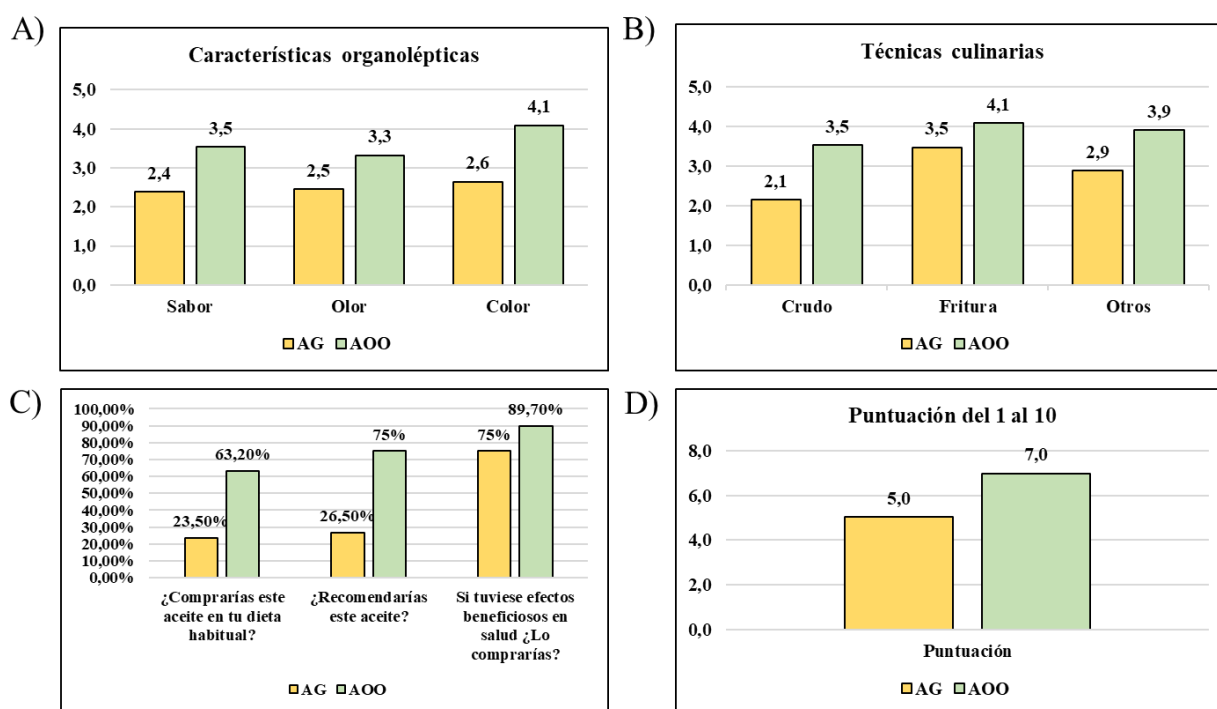


Figura 20. Valoración del grado de satisfacción de los voluntarios con el aceite de orujo de oliva (AOO) y el aceite de girasol (AG). La figura “C” muestra el porcentaje de respuestas afirmativas.

Además, se preguntó a los participantes si comprarían o recomendarían el AOO y el AG. El 63,2% y el 75% de los participantes afirmaron que comprarían y recomendarían el AOO, respectivamente. En cambio, las respuestas a estas cuestiones cuando fueron formuladas con el AG recibieron una menor puntuación, con un 23,5% de respuestas positivas a la pregunta de si lo comprarían, y un 26,5% a la pregunta de si lo recomendarían. Finalmente, la puntuación general del AOO (7,0) fue superior a la

obtenida por el AG (5,0) (Figura 20). Estos resultados coinciden con los obtenidos en la encuesta a los participantes en el estudio anterior, quienes también valoraron mejor en todos los atributos al AOO en comparación con el AGAO. Es interesante observar que la valoración del AG fue peor que la recibida por el AGAO, sugiriendo una aportación positiva del mayor contenido en ácido oleico en el AGAO en comparación con el AG en los atributos organolépticos y comportamiento culinario, así como en la valoración global de ambos aceites de semilla.

## **Artículo III.- Evaluación del efecto en salud del aceite de orujo de oliva comparado con el aceite de girasol alto oleico y el aceite de girasol.**

### **3.1. Resumen**

Los dos estudios de intervención realizados en la presente Tesis Doctoral han permitido evaluar los efectos en salud del consumo prolongado de AOO en comparación con el AGAO (primer estudio) y el AG (segundo estudio) tanto en sujetos sanos como con moderado riesgo cardiovascular. A continuación, dado que en ambos estudios se valoraron los mismos biomarcadores en semejantes grupos de estudio (sujetos normo- e hipercolesterolémicos), se integraron los resultados obtenidos en los dos ensayos clínicos controlados, aleatorizados, ciegos y cruzados llevados a cabo en un total de 65 adultos normocolesterolémicos y 67 moderadamente hipercolesterolémicos. Como se describe en los artículos anteriores, cada estudio tuvo una duración de catorce semanas, con dos fases de intervención de cuatro semanas (AOO frente a AGAO o AG), cada una de ellas precedida por un período basal y con una etapa de lavado, ambas de tres semanas de duración.

Los resultados muestran que el consumo regular de AOO redujo los niveles de CT ( $p=0,017$ ), LDL-C ( $p=0,018$ ) y el perímetro de la cintura ( $p=0,026$ ). Además, en el grupo sano, los niveles de MDA ( $p=0,004$ ) disminuyeron tras la ingesta de AOO en comparación con el AGAO. Por el contrario, tras la intervención dietética con el AG y el AOO se pudo apreciar un aumento significativo de la Apo B ( $p<0,001$ ) y la relación Apo B/Apo A1 ( $p<0,001$ ), siendo esta subida menos acusada tras la ingesta de AOO. Adicionalmente, se observó una menor resistencia a la insulina en el grupo de sujetos sanos, disminuyendo los valores de insulina ( $p=0,004$ ) y del índice HOMA-IR ( $p=0,015$ ), y la vez aumentando en el índice QUICKI ( $p=0,049$ ) tras el consumo de AOO. Los marcadores de inflamación analizados no mostraron variaciones significativas por efecto del aceite. Por último, la hormona anorexigénica leptina ( $p=0,005$ ) experimentó un incremento tras la ingesta de AOO en el grupo hipercolesterolémico, aumentando también tras el consumo de los aceites de semilla.

De manera general estos resultados sugieren que la ingesta de AOO puede mejorar biomarcadores de riesgo cardiometabólico, especialmente al reducir los parámetros relacionados con el colesterol, el perímetro de la cintura y la oxidación lipídica en sujetos

sanos e hipercolesterolémicos. Además, la modulación positiva en el grupo normocolesterolémico de biomarcadores e índices que evalúan la resistencia y sensibilidad a la insulina, sugieren que el consumo de AOO puede conducir a un menor riesgo de padecer DM2 en consumidores sanos.

### 3.2. Artículo III

<b>Título</b>	Olive Pomace Oil versus High Oleic Sunflower Oil and Sunflower Oil: A Comparative Study in Healthy and Cardiovascular Risk Humans
<b>Autores</b>	Susana González-Rámila, Raquel Mateos, Joaquín García-Cordero, Miguel Ángel Seguido, Laura Bravo-Clemente y Beatriz Sarriá
<b>Revista</b>	Foods, 11(15), 2186
<b>Año</b>	2022
<b>DOI</b>	10.3390/foods11152186.

Article

# Olive Pomace Oil versus High Oleic Sunflower Oil and Sunflower Oil: A Comparative Study in Healthy and Cardiovascular Risk Humans

Susana González-Rámila, Raquel Mateos, Joaquín García-Cordero, Miguel A. Seguido , Laura Bravo-Clemente  and Beatriz Sarriá \* 

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain; s.gonzalez@ictan.csic.es (S.G.-R.); raquel.mateos@ictan.csic.es (R.M.); j.garcia@ictan.csic.es (J.G.-C.); m.seguido@ictan.csic.es (M.A.S.); lbravo@ictan.csic.es (L.B.-C.)

\* Correspondence: beasarria@ictan.csic.es; Tel.: +34-915-492-300

**Abstract:** Olive pomace oil (OPO) is mainly a source of monounsaturated fat together with a wide variety of bioactive compounds, such as triterpenic acids and dialcohols, squalene, tocopherols, sterols and aliphatic fatty alcohols. To date, two long-term intervention studies have evaluated OPO's health effects in comparison with high oleic sunflower oil (HOSO, study-1) and sunflower oil (SO, study-2) in healthy and cardiovascular risk subjects. The present study integrates the health effects observed with the three oils. Two randomized, blinded, cross-over controlled clinical trials were carried out in 65 normocholesterolemic and 67 moderately hypercholesterolemic subjects. Each study lasted fourteen weeks, with two four-week intervention phases (OPO versus HOSO or SO), each preceded by a three-week run-in or washout period. Regular OPO consumption reduced total cholesterol ( $p = 0.017$ ) and LDL cholesterol ( $p = 0.018$ ) levels as well as waist circumference ( $p = 0.026$ ), and only within the healthy group did malondialdehyde ( $p = 0.004$ ) levels decrease after OPO intake versus HOSO. Contrarily, after the SO intervention, apolipoprotein (Apo) B ( $p < 0.001$ ) and Apo B/Apo A ratio ( $p < 0.001$ ) increased, and to a lower extent Apo B increased with OPO. There were no differences between the study groups. OPO intake may improve cardiometabolic risk, particularly through reducing cholesterol-related parameters and waist circumference in healthy and hypercholesterolemic subjects.

**Keywords:** olive pomace oil; high oleic sunflower oil; sunflower oil; lipid profile; lipid peroxidation; anthropometric parameters; clinical trial



**Citation:** González-Rámila, S.; Mateos, R.; García-Cordero, J.; Seguido, M.A.; Bravo-Clemente, L.; Sarriá, B. Olive Pomace Oil versus High Oleic Sunflower Oil and Sunflower Oil: A Comparative Study in Healthy and Cardiovascular Risk Humans. *Foods* **2022**, *11*, 2186. <https://doi.org/10.3390/foods11152186>

Academic Editors: Rafat A. Siddiqui and Muhammad Y. Sheikh

Received: 21 June 2022

Accepted: 19 July 2022

Published: 22 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The content and quality of dietary fat is one of the most controversial issues in the field of nutrition and dietetics. National and international nutritional guidelines and recommendations share similar figures for total dietary fat intake, i.e., between 20–35% of daily energy for the general population [1,2]. However, the PREDIMED (PREvention with MEDiterranean Diet) study opened new avenues by proposing that total fat intake may cover up to 40.5% of daily energy, provided that olive oil is one of the main sources (20–25%, 45–55 mL/d) [3,4]. Virgin and extra virgin olive oil (VOO and EVOO, respectively) have well established nutritional benefits and health effects, especially against cardiovascular diseases (CVDs), which have been extensively demonstrated in clinical studies [5–7]. These properties have been attributed to the high content in monounsaturated fatty acids (MUFA), as well as valuable minor components such as phenols, phytosterols, tocopherols and squalene [7,8]. In contrast, the health effects of other categories of olive oil, such as olive pomace oil (OPO), have been less studied.

Olive oil extraction generates huge quantities of byproducts, and thus has severe environmental impact. Considering that OPO is obtained from the product that remains after VOO has been mechanically extracted [9,10], the consumption of this oil fosters the sustainability of the olive oil chain and promotes circular economy. OPO contains a high percentage of oleic acid (56–85% of the total fatty acids) and a wide variety of bioactive compounds, such as triterpenic acids and dialcohols, squalene, tocopherols, sterols, aliphatic fatty alcohols and phenolic compounds [11–13]. As a consequence of the extraction and refining processes carried out to obtain this oil, OPO differs from VOO in the content of certain minor components, lacking (poly)phenols, but then it contains higher concentrations of triterpenic compounds (mainly pentacyclic terpenic acids and diols) and aliphatic fatty alcohols than VOO [10,13]. In vivo or preclinical studies carried out with some of the above compounds have demonstrated cardioprotective properties through the modulation of lipid profile, improvement of endothelial function, induction of antihypertensive effects, reduction of inflammation levels and improvement of biomarkers related to diabetes and obesity prevention [10,12,14–16].

Due to OPO's organoleptic properties, particularly its mild taste, compared to other categories of olive oil, it is more suitable for frying, and thus it is mainly demanded as a "frying oil". Sunflower oil (SO) is also commonly used as a frying oil due to its neutral taste. In contrast to OPO, SO is a polyunsaturated fat with a high linoleic acid content that is consumed worldwide due to its frying performance, accessibility and price [17]. The growing number of claims in favor of olive oil consumption led the food industry to introduce high oleic sunflower oil (HOSO; with an oleic acid content similar to olive oil) obtained by selection or genetic modification that additionally has shown high thermal stability [18]. OPO's frying behavior has recently been evaluated in a study conducted by Holgado et al. [19] in which OPO showed better discontinuous frying performance compared to SO and HOSO. Unlike OPO, SO's health properties have been evaluated in numerous clinical trials in comparison with other fat sources such as coconut oil [20], canola oil, olive oil [21] and flaxseed oil [22]. Among these studies, only in the intervention by Akrami et al. [22], after the consumption of 25 mL/d of SO for 7 weeks, beneficial effects on lipid profile, blood pressure and anthropometric measures were described. On the other hand, already in 2007, the beneficial effects of HOSO on the concentrations of total cholesterol (T-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were observed after the consumption of 3.9 g/d of this vegetable oil for 12 weeks [23].

Bearing in mind the lack of human studies with OPO and its great health potential due to its composition, the aim of this research was to assess the effects of regular intake of OPO compared to the widely used SO and the nutritionally improved HOSO on biomarkers of cardiovascular health and associated pathologies (hypertension, diabetes and obesity) in healthy volunteers and subjects at cardiovascular risk. For this purpose, two randomized, blinded, cross-over controlled clinical trials, in which OPO was compared with HOSO (Study 1) and SO (Study 2), were integrated.

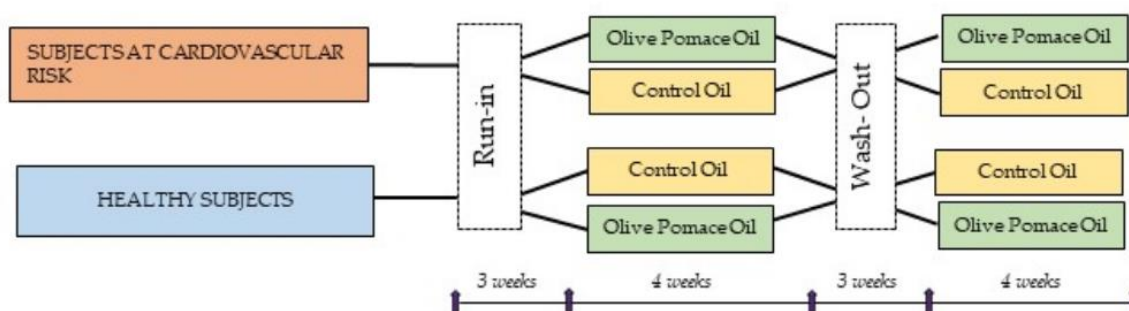
## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemical Characterization of the Study Oils

The oils used in the study were analyzed according to the following standardized methods: ISO 12228-2:2014 method for the determination of sterols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex V for determining triterpenic alcohols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex XIX for determining aliphatic alcohols; Regulation (EEC) No. 2568/91 Annex X for determining fatty acid composition; and ISO 9936:2016 for determining tocopherols and tocotrienols. Triterpenic acids were analyzed following the method of Pérez-Camino & Cert (1999) [24], and squalene was determined by gas chromatography (Giacometti, 2001) [25]. Phenols were analyzed by high-performance liquid chromatography with on-line diode array detection (HPLC-DAD) according to the procedure by Mateos et al. (2001) [26].

## 2.2. Study Design and Intervention

In the present study, the data obtained from the only two randomized, blinded, crossover, controlled clinical trials developed with OPO are integrated. Each study lasted 14 weeks and consisted of two four-week intervention phases, preceded by a three-week run-in or a washout period. In the first study, after a three-week run-in period with SO, half of the volunteers of each study group consumed OPO, and the other half consumed HOSO for four weeks. Then, after a three-week washout period with SO, participants consumed the other oil (OPO or HOSO) for four weeks (Figure 1). Regarding the second study, the same study design was applied, but instead, OPO was compared to SO and corn oil (CO) was used as the run-in/washout oil (Figure 1).



**Figure 1.** Study design. The arrows indicate the visits performed.

Participants attended the Human Nutrition Unit (HNU) of the Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) before and after each stage; therefore, five visits were made in both studies (Figure 1). At each visit, volunteers arrived at the HNU after an overnight fast and provided a sample of their first morning urine and the 72 h food intake record they had completed. Subsequently, blood samples were collected and blood pressure and body composition were measured. Before leaving, the volunteers were provided with the study oil according to the stage of the study. Participants were instructed to substitute the oil they usually consumed with 45 g/d (equivalent to 4–5 tablespoons) of the study oil (OPO, HOSO or SO for Study 1, and OPO, SO or CO for Study 2) to cover 20% of the daily energy intake of monounsaturated fats (equivalent to 44–67 g/d for 2000–3000 Kcal/d, respectively) following the Spanish Society of Community Nutrition (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, SENC) recommendations. In addition, they had to maintain their lifestyle and dietary habits, except from certain food rich in mono- and polyunsaturated fats (olives, sunflower seeds, nuts, avocado, margarine, butter and mayonnaise), which were restricted. Participants received more oil than necessary (1 L/week) to avoid the use of other oils in culinary preparations for the family; for this reason, participants did not return the oil at the end of each stage.

## 2.3. Subjects

Volunteers were recruited mainly from a database of volunteers who participated in previous studies carried out in ICTAN by placing advertisements at the faculties of the Complutense University of Madrid, and through social networks. Men and women aged between 16 and 55 years with a body mass index (BMI) less than 30 kg/m<sup>2</sup> who met the following inclusion criteria were recruited; they were required to not be under medical treatment, not suffer from pathologies or chronic disorders other than moderate hypercholesterolemia in subjects at cardiovascular risk, not be smokers, not be vegetarians, not be pregnant women, and not take vitamins or dietary supplements. Participants were divided into two groups according to their T-C and LDL-C levels, which were determined in a consented blood test: normocholesterolemic subjects (T-C < 200 mg/dL; LDL-C < 135 mg/dL) and hypercholesterolemic subjects (T-C 200–300 mg/dL; LDL-C 135–175 mg/dL). Studies

were conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda in Madrid (Spain) and the Bioethics Committee of Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Written informed consent was obtained from all subjects. The studies were registered in Clinical Trials: Study 1 (NCT04997122) and Study 2 (NCT04998695).

#### 2.4. Randomization and Blinding

All participants who met the inclusion criteria were randomly assigned to start with OPO or the control oil (HOSO for Study 1, and SO for Study 2) in a 1:1 ratio. Assignment of codes to participants, randomization and allocation to each oil were performed by different members of the research team using Microsoft<sup>®</sup> Excel 2016 software version 16.0 (Washington, DC, USA). According to T-C and LDL-C levels, two groups (normo- and hypercholesterolemic) were established regardless of sex. To blind the volunteers, the oils were presented in the same type of bottle, although with different color caps. The correspondence between the color and the study oil was known only by members of the research team.

#### 2.5. Dietary Control and Compliance

The data obtained from the 72 h food intake records, which were filled out at each stage of the study, were processed using the DIAL<sup>®</sup> program (Faculty of Pharmacy-Universidad Complutense de Madrid and Alce Ingeniería). Thus, intake of energy, macronutrients (proteins, fats and carbohydrates), micronutrients (vitamins and minerals) and dietary fiber were obtained. In this record, volunteers were instructed to indicate as accurately as possible the ingredients and quantities of food consumed. When a scale was available, they were asked to record the weight of the portions consumed; otherwise, a practical manual (Manual of Nutrition and Dietetics, UCM) was provided to facilitate the interpretation of the weights and usual portions. Compliance regarding test oil intake and dietary restrictions was monitored by weekly calling and emailing volunteers.

#### 2.6. Lipid Profile and Endothelial Biomarker Analysis

At each visit, a fasting blood sample was drawn in blood tubes without anticoagulant or EDTA-coated to obtain serum and plasma samples, respectively. After separation by centrifugation, the samples were frozen at  $-80$  °C until analysis. T-C, triglycerides (TG) and HDL-C levels, as well as apolipoproteins A1 (Apo A1) and B (Apo B) were determined in serum samples following reference methods or methods recommended by Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) using a Roche Cobas Integra 400 plus analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). LDL and VLDL (very low-density lipoprotein) were calculated according to the Friedewald formula— $LDL = T-C - (HDL-C + TG)$ ;  $VLDL = TG/5$  [27]—and Apo B/Apo A1, LDL/HDL and T-C/HDL ratios were calculated.

Regarding endothelial function biomarkers, endothelial nitric oxide synthase (eNOS, SEA868Hu), E-selectin (SEA029Hu) and P-selectin (SEA569Hu) plasma concentrations were determined in duplicate by ELISA (Cloud-Clone Kit Corp., Katy, TX, USA) using a Bio-Tek<sup>®</sup> Synergy<sup>™</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader controlled by BioTek<sup>®</sup> Gen5 version 2.01.14 software (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

#### 2.7. Blood Pressure and Anthropometric Measurements

At the end of each stage, after volunteers had rested for 5 min, systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure was measured in triplicate using an OMRON<sup>®</sup> M2 HEM-7121-180 E sphygmomanometer (OMRON HEALTHCARE Co., Ltd., Kyoto, Japan), waiting for 3 min between measurements.

In order to determine the effect of OPO, HOSO and SO consumption on body composition, height and body circumferences (waist and abdomen) were measured using a

height rod (Soehnle Professional, GmbH) and a measuring tape (Fisaude ADE, Spain), respectively. In addition, weight and the percentage of body fat were estimated using a single-frequency tetrapolar electrical bioimpedance using a Tanita® BC 601 segmented body composition analyzer which includes a digital scale (Tanita Europe BV, Amsterdam The Netherlands). Waist to hip and waist to height ratios were calculated.

### 2.8. Analysis of Antioxidant Capacity and Oxidation Biomarkers

Antioxidant activity was measured in serum samples by the ABTS radical cation [28] and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) methods [29], and the reducing capacity was determined by the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay [30]. Trolox was used as a standard and results were expressed as  $\mu\text{M}$  of Trolox equivalent (TE). Low-density lipoprotein oxidation (LDLox) levels were determined in serum samples by ELISA assay according to the protocols attached in Cloud-Clone Corp. kit (Katy, TX, USA). These parameters were analyzed using a Bio-Tek® Synergy™ HT Multi-Detection plate reader (Highland Park, Winooski, VT, USA) controlled by BioTek® Gen5 software version 2.01.14.

Malondialdehyde (MDA) levels were measured as a biomarker of lipid oxidation. MDA was determined in serum samples by high-performance liquid chromatography (HPLC) following the methodology proposed by Mateos et al. [31]. For this purpose, a 1200 series HPLC equipment (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a Nucleosil 120 C18 column (25 mm  $\times$  0.46 mm, particle size 5  $\mu\text{m}$ , TeknoKroma) were used.

### 2.9. Statistical Methods

The study design took the group (normocholesterolemic/hypercholesterolemic) and treatment (OPO, HOSO or SO) (repeated measures) as fixed factors and the order of intake as a random factor. In addition, to control for possible variability between the two populations, the study (Study 1 or Study 2) was also taken as a random factor (without repeated measures).

The statistical models applied to analyze the results of this study are presented below:

1. A general linear repeated measures model was used to analyze energy, macronutrient and micronutrient intakes over the course of each study, so that values at baseline, initial (pre-treatment) and final (post-treatment) results were compared. The order of intake was not taken into account. Results are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean.
2. A linear mixed model was applied to study the rate of change [(post-treatment value—pre-treatment value)/pre-treatment value] of each variable within each group (normocholesterolemic or hypercholesterolemic). This statistical model takes into account the correlated and non-constant variability of the data. Thus, it is possible to contemplate the order of oil intake. The statistical model was full factorial, considering group (normocholesterolemic or hypercholesterolemic), treatment oil (OPO, HOSO or SO) and group\*treatment interaction, while the order of intake was a random effect. Results are expressed in percentage as mean  $\pm$  standard error of the mean.

Data were analyzed using SPSS software (version 27.0; SPSS, Inc., IBM Company New York, NY, USA). Prior to the aforementioned statistical analysis, the data distribution was tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. The box plot was applied to check the distribution of all variables. Furthermore, the Bonferroni test (within each group) was performed to pairwise compare the effect of the intake of each oil (OPO, HOSO and SO). The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results and Discussion

VOO and EVOO are extracted under conditions which allow the oil to retain distinctive flavor compounds from the olives [19]. Thus, although the nutritional and health properties of VOO and EVOO are unquestionable, the bitter aftertaste may make them less suitable for cooking and in addition, their cost is higher than other seed oils, particularly in countries

with no olive oil production [17]. Bearing this in mind, OPO, due to its mild flavor and cooking properties, is an interesting alternative to HOSO and SO, which are consumed worldwide [19]. Moreover, OPO has relevant health potential according to *in vitro* and preclinical studies carried out mainly using OPO, enriched OPO or OPO components [13]. However, to date, no free-living, long-term intervention has been carried out in healthy and cardiovascular risk humans replacing the oil usually consumed with OPO in the context of their habitual diet to better understand OPO's effects on cardiovascular health and associated comorbidities.

### 3.1. Chemical Composition of the Study Oils

The chemical characterization of the vegetable oils compared in this study, OPO, HOSO and SO, is shown in Supplementary Table S1. OPO and HOSO are two monounsaturated fat sources with a high oleic acid content, 71% and 76.5%, respectively, whereas SO is a polyunsaturated fat source due to its high linoleic acid content (58.6%). As far as minor components are concerned, OPO, HOSO and SO showed similar  $\alpha$ -tocopherol (OPO: 357 mg/kg; HOSO: 420 mg/kg; SO: 518 mg/kg) and phenolic compounds (<2.0 mg/kg in OPO, HOSO and SO) content. Nevertheless, OPO showed a considerably higher content in squalene (799 mg/kg), aliphatic alcohols (978 mg/kg), triterpenic alcohols (886.6 mg/kg) and triterpenic acids (196 mg/kg) compared to the low content or absence in HOSO (87 mg/kg squalene; 32 mg/kg aliphatic alcohols; <2.0 mg/kg triterpenic alcohols and acids) and SO (117 mg/kg squalene; 26 mg/kg aliphatic alcohols; <2.0 mg/kg triterpenic alcohols and acids). OPO's chemical composition was within the ranges reported in the review by Mateos et al. [13], with the exception of alpha tocopherol (357 mg/kg), which was slightly above the range of 185–300 mg/kg, and aliphatic fatty alcohols (978 mg/kg), which were marginally under (1000–3000 mg/kg) [13]. With respect to SO and HOSO, the fatty acid composition was similar to that determined in previous studies [19].

Regarding the oils used in the washout periods, sunflower (SO) and corn oil (CO), their composition is quite alike. Both SO and CO oil are polyunsaturated fats with a similar content in their major components: linoleic acid (58.48% and 50.52% in SO and CO, respectively) followed by oleic acid (29.76% and 35.36% in SO and CO, respectively). With respect to minor compounds (representing about 2% of the total composition), the content of triterpenic acids (<2.0%), triterpene alcohols (<1.0%) and phenols (<1.0%) were similar in both oils, whereas their content in aliphatic fatty alcohols (38 mg/kg and 29 mg/kg in SO and CO, respectively) and tocopherols (230 mg/kg and 246 mg/kg in SO and CO) differed very little. In contrast, the contents of squalene, tocotrienols and sterols were slightly higher in CO (squalene: 548 mg/kg; tocotrienols: 19 mg/kg; sterols: 8962.0 mg/kg) compared to SO (squalene: 314 ppm; tocotrienols:—mg/kg; sterols: 2820.5 mg/kg).

### 3.2. Participants' Characteristics, Dietary Control and Compliance

Of the 144 volunteers recruited, 132 successfully completed both studies: 65 were normocholesterolemic and 67 hypercholesterolemic. The baseline characteristics of the subjects are shown in Table 1. As expected, variables related to lipid profile were higher in the cardiovascular risk group compared to in the healthy. Additionally, anthropometric and blood pressure measurements were higher in the hypercholesterolemic group.

The assessment of dietary energy, macronutrient and micronutrient intakes are shown in Table 2. Repeated measures analysis revealed that energy, protein, carbohydrate and lipid intake did not vary in the normo- or hypercholesterolemic group after OPO, HOSO and SO intake (Table 2), confirming that participants maintained their dietary habits throughout the study as requested and replaced the oil usually consumed with the test oil. To assess energy and nutrient intake, the recommended daily intakes reported by Moreiras et al. [32] were taken as reference values. Regarding total caloric intake (Table 2), mean values ranged from 1966 to 2261 kcal/d, which are slightly under the recommended for healthy adults (2000–3000 kcal/d). This result is not a surprise, because although volunteers were instructed on how to fill in the dietary records, there is a widespread tendency to underes-

timate the amount of food consumed. Considering this drawback, regarding macronutrient intake, the distribution of protein (between 80–98 g/d), carbohydrate (between 175–214 g/d) and lipid (between 88–102 g/d) intake accounted for 17%, 38% and 40.6%, respectively (Table 2). These values were not within the recommended ranges of 10–15%, 50–60% and 30–35% for protein, carbohydrate and lipid intake, respectively, showing higher protein and lipid intake at the expense of lower carbohydrate intake. These results agree with previous studies that point to diets in Mediterranean countries moving away from the Mediterranean dietary pattern [33,34], with a recurrent tendency to consume more proteins and lipids and less carbohydrates as observed in other studies [35].

**Table 1.** Baseline characteristics of participants in both studies.

	Normocholesterolemic	Hypercholesterolemic
Men, <i>n</i>	21	36
Women, <i>n</i>	44	31
Age (years)	31 ± 1	43 ± 1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.6 ± 0.6	25.7 ± 0.5
Waist circumference (cm)	75.6 ± 1.7	85.0 ± 1.7
Total cholesterol (mg/dL)	177.0 ± 2.8	239.2 ± 3.3
LDL cholesterol (mg/dL)	97.5 ± 2.6	149.4 ± 3.7
Systolic blood pressure (mmHg)	114.3 ± 1.5	121.6 ± 1.8
Diastolic blood pressure (mmHg)	74.2 ± 1.0	79.5 ± 1.3

Values represent mean ± standard error of mean. BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein.

Consumption of SFA (between 24–31 g/d), MUFA (between 28–46 g/d) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) (between 10.3–33.2 g/d) accounted for 12.3%, 15.6% and 9.5% (obtained from mean values) of total dietary energy, respectively. SFA intake (12.3% of the total diet) showed no variation in either group and was above the total recommended intake (<7%). As for MUFA consumption (15.6% of the total diet), it was close to the recommended intake (17%) and, as expected, it showed significant changes ( $p < 0.001$ ) in both the normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups due to the treatment oil (OPO, HOSO and SO) (Table 2). According to the Bonferroni test, MUFA consumption was similar at baseline and after OPO and HOSO intake (Table 2), which may be related to the fact that volunteers usually consumed VOO, with a high content in MUFA, similar to OPO and HOSO, both rich in MUFA. However, the mean intake of PUFA (9.5% of the total diet) was above the 3–6% recommended intake. This parameter also experienced variations after OPO, HOSO and SO intake ( $p < 0.001$ ) in both groups, which reflected the different contents in PUFA in the test oils, so that it increased after SO intake, rich in polyunsaturated fatty acids, and decreased after OPO and HOSO intervention (Table 2). With respect to total cholesterol intake, which was slightly above the 300 mg/d recommendation, there were no significant differences due to dietary intervention. There were also no differences in the intake of dietary fiber, which remained close to the lower limit recommended (25–35 g/d; Table 2). Finally, vitamin E consumption showed statistically significant variations associated with the consumption of the different oils ( $p < 0.001$ ) in both groups. Baseline intake (9.1–9.5 mg/d) was below the recommended 12 mg/d [36]; however, the intake increased significantly after OPO, HOSO and SO consumption (15.4–28.1 mg/d; Table 2), without differences among the study oils, due to the higher content in vitamin E of these oils compared to VOO, which was the habitual oil consumed by volunteers.

Table 2. Energy intake and dietary components.

	Normocholesterolemic							<i>p</i> Value
	Baseline	OPO ( <i>n</i> = 65)		HOSO ( <i>n</i> = 34)		SO ( <i>n</i> = 31)		
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	
Energy (kcal/day)	2078 ± 60	1966 ± 57	2017 ± 64	2198 ± 83	2087 ± 92	2017 ± 63	2006 ± 59	0.394
Proteins (g/day)	89 ± 3	82 ± 3	86 ± 3	96 ± 4	91 ± 5	87 ± 4	80 ± 3	0.132
Carbohydrates (g/day)	196 ± 7	191 ± 8	190 ± 8	209 ± 10	205 ± 10	176 ± 7	175 ± 7	0.087
Lipids (g/day)	95 ± 4	89 ± 3	92 ± 4	100 ± 5	92 ± 5	98 ± 4	100 ± 4	0.395
SFA (g/day)	31 ± 1	27 ± 1	28 ± 1	29 ± 2	27 ± 2	30 ± 1	28 ± 2	0.065
MUFA (g/day)	41 ± 2 <sup>a</sup>	29 ± 1 <sup>b</sup>	45 ± 2 <sup>a</sup>	31 ± 2 <sup>b</sup>	46 ± 3 <sup>a</sup>	33 ± 1 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	<0.001
PUFA (g/day)	14.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	25.1 ± 1.4 <sup>bd</sup>	12.5 ± 0.6 <sup>ac</sup>	30.1 ± 1.8 <sup>bd</sup>	10.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	26.4 ± 1.3 <sup>b</sup>	33.2 ± 1.8 <sup>d</sup>	<0.001
Cholesterol (mg/day)	327 ± 16	314 ± 18	334 ± 17	365 ± 27	335 ± 41	334 ± 18	340 ± 21	0.769
Dietary fiber (g/day)	21 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	23 ± 1	22 ± 1	20 ± 1	21 ± 1	0.821
Vitamin E (mg/day)	9.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	20.5 ± 1.3 <sup>b</sup>	17.2 ± 1.0 <sup>c</sup>	24.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	17.8 ± 1.3 <sup>c</sup>	16.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	26.1 ± 1.6 <sup>b</sup>	<0.001
	Hypercholesterolemic							<i>p</i> Value
	Baseline	OPO ( <i>n</i> = 67)		HOSO ( <i>n</i> = 30)		SO ( <i>n</i> = 37)		
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	
Energy (kcal/day)	2099 ± 52	2146 ± 61	2079 ± 56	2261 ± 95	2084 ± 106	2006 ± 93	2027 ± 97	0.158
Proteins (g/day)	93 ± 3	91 ± 3	90 ± 3	98 ± 4	89 ± 5	84 ± 5	83 ± 4	0.121
Carbohydrates (g/day)	201 ± 8	206 ± 8	200 ± 7	214 ± 12	212 ± 16	200 ± 12	197 ± 13	0.721
Lipids (g/day)	91 ± 3	95 ± 3	91 ± 4	102 ± 6	88 ± 6	88 ± 5	91 ± 5	0.122
SFA (g/day)	29 ± 1	29 ± 1	28 ± 1	30 ± 2	24 ± 2	28 ± 2	28 ± 2	0.223
MUFA (g/day)	41 ± 2 <sup>a</sup>	31 ± 1 <sup>b</sup>	44 ± 2 <sup>a</sup>	32 ± 2 <sup>b</sup>	46 ± 4 <sup>a</sup>	29 ± 2 <sup>b</sup>	28 ± 2 <sup>b</sup>	<0.001
PUFA (g/day)	12.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	26.9 ± 1.4 <sup>b</sup>	12.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	30.5 ± 2.7 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	23.5 ± 1.6 <sup>b</sup>	26.2 ± 1.9 <sup>b</sup>	<0.001
Cholesterol (mg/day)	358 ± 17	320 ± 20	346 ± 22	334 ± 25	308 ± 29	293 ± 22	354 ± 31	0.298
Dietary fiber (g/day)	24 ± 2	24 ± 1	23 ± 1	28 ± 2	23 ± 2	20 ± 2	22 ± 2	0.230
Vitamin E (mg/day)	9.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	20.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	19.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	28.1 ± 2.7 <sup>b</sup>	17.7 ± 1.5 <sup>c</sup>	15.4 ± 1.2 <sup>c</sup>	20.9 ± 1.5 <sup>b</sup>	<0.001

Values represent mean ± standard error of mean. Data were analysed using a general linear repeated measures model. Superscripts correspond to significant differences within the normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H) group according to the Bonferroni test. *p* values correspond to the comparing baseline, initial and final effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO). Significance level was set at *p* < 0.05. SFA: saturated fatty acid. MUFA: monounsaturated fatty acid. PUFA: polyunsaturated fatty acid.

### 3.3. Lipid Profile

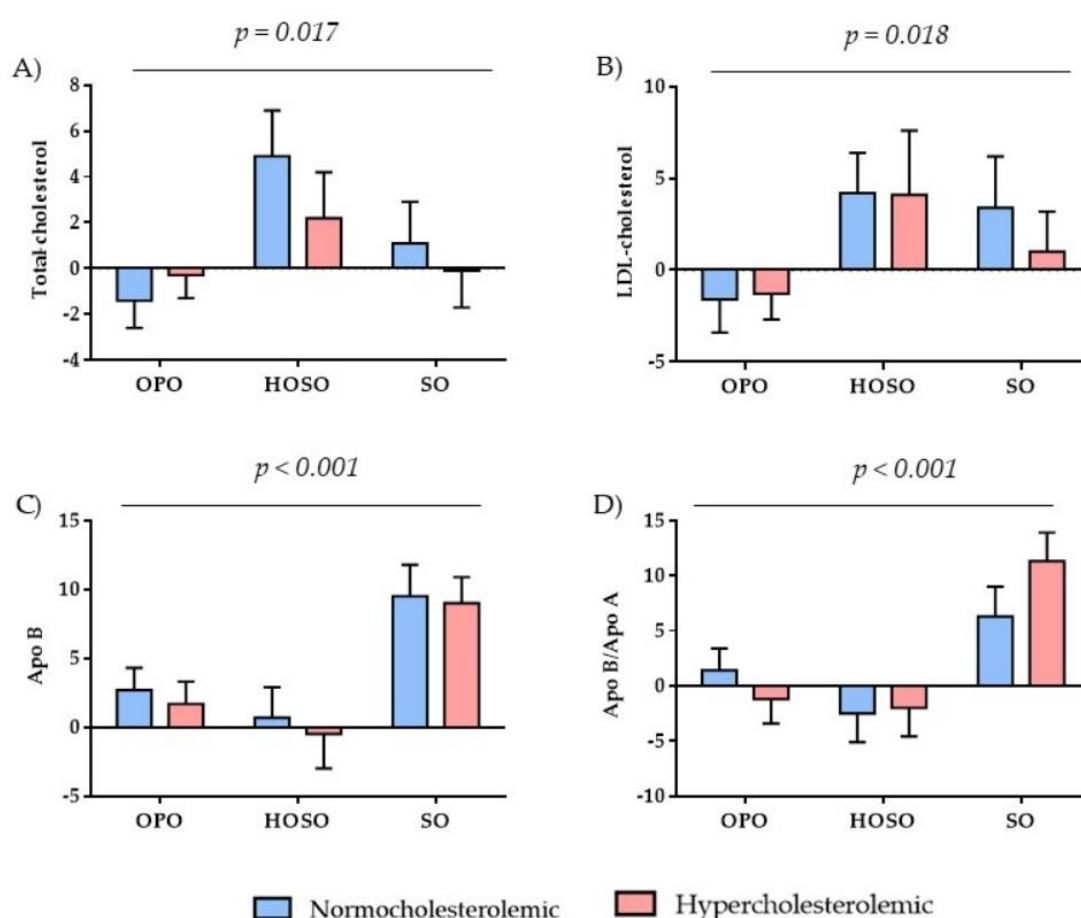
The effects of regularly consuming OPO, HOSO and SO on the volunteer's lipid profile are shown in Supplementary Table S2. The changes in T-C (*p* = 0.017), LDL-C (*p* = 0.018), Apo B (*p* < 0.001) and Apo B/Apo A1 (*p* < 0.001) ratio (Figure 2) induced

by the oils studied were statistically significant, whereas the effects of the study groups (normocholesterolemic and hypercholesterolemic) were not statistically significant in any the parameters studied. It is noteworthy that, after sustained OPO consumption, the change rate of T-C and LDL-C levels were negative, thus indicating that these parameters decreased at the end of the intervention compared to the beginning. In contrast, after regularly consuming HOSO and SO, T-C and LDL-C slightly increased, except for T-C in the risk group after SO ingestion ( $-0.1\% \pm 1.6\%$ ; Supplementary Table S2). The potential cardioprotective effects of OPO on T-C and LDL-C are reinforced with the decrease in the LDL-C/HDL-C ratio observed after OPO intake, which was close to the level of statistical significance ( $p = 0.056$ ) (Supplementary Table S2). These results suggest that OPO may exert positive hypolipidemic effects in both healthy and cardiovascular risk subjects, in agreement with the review by Mateos et al. [13], which highlights the cardioprotective potential of OPO. These effects may be associated to OPO's content in triterpenic acids, mainly maslinic and oleanolic acid, in the unsaponifiable fraction, as these compounds have already been related with improving blood lipid levels [10,12,16]. In agreement, in a study carried out in hyperlipidemic patients who consumed four tablets of oleanolic acid at once/three times a day (the exact quantity administered is not indicated) for 4 weeks, reduced levels of T-C, TG and LDL-C were described [37]. Similarly, in obese mice that consumed OPO with a high content in oleanolic and maslinic acids for 10 weeks, a decrease in T-C and TG levels was reported [12]. These results along with the fact that HOSO, also rich in MUFA, did not show similar effects on T-C and LDL-C concentration, sustain our hypothesis that OPO's hypolipidemic effects can be mainly attributed to its content in minor bioactive components.

The slight increase in T-C and LDL-C concentrations following HOSO intake contrasts with the results obtained in a previous intervention study carried out in healthy subjects, where the consumption of 3.9 g/d of HOSO for 12 weeks was related to a reduction in T-C, LDL-C and HDL-C concentrations [23]. In contrast, the lack of reduction in T-C and LDL-C concentration after SO consumption is in agreement with human studies that assessed the effects of consuming SO on blood lipids in comparison with flaxseed oil [22], coconut oil [20], canola oil and olive oil [21]. According to the Regulation (EC) No 432/2012, OPO and HOSO are high monounsaturated fats, whereas SO is high polyunsaturated fat. In addition, the Regulation indicates that replacing saturated fats with unsaturated fats (both mono and polyunsaturated) in the diets contributes to the maintenance of normal cholesterol [38]. The present results would not support the claim, as the effects on T-C were different between the two monounsaturated oils (OPO and HOSO) and the polyunsaturated fat (SO), and the volunteers did not replace saturated fats with the unsaturated fats here studied, as they usually consumed VOO and in some cases SO for cooking.

Apolipoproteins are crucial components of lipoprotein particles that help to predict the risk of cardiovascular disease, as they modulate the activity of specific enzymes that act on lipoproteins, maintain the structural integrity of the lipoprotein complex, and are ligands for specific cell surface receptors to assist lipoprotein uptake [39]. Therefore, Apo B, Apo A1 and Apo B/Apo A1 ratio are considered as important predictors of CVD alongside with lipid profile biomarkers. On one hand, elevated serum Apo B levels are associated with increased arterial wall injury, as Apo B is the main apolipoprotein involved in the initiation and progression of atherosclerosis and it is present in chylomicrons, VLDL and intermediate density (IDL), LDL-C and lipoprotein(a) [Lp(a)] particles [40]. On the other hand, Apo A1 acts as a receptor key in the transfer of phospholipids and free cholesterol from peripheral tissues. In addition, this apolipoprotein, which is the largest component of the HDL-C particle [41], transfers cholesterol to the liver and other tissues for excretion and steroidogenesis, which is related to the protective action of Apo A1 and HDL-C in cardiovascular health [39]. Consequently, high Apo A1 levels are associated with a low cardiovascular risk index, and the Apo B/Apo A1 ratio is a representative marker of the atherogenic/anti-atherogenic molecule ratio, so that an increase in the ratio is associated with cardiovascular events [42]. According to Figure 2, Apo B increased after SO intake,

as well as with OPO to a lower extent ( $p < 0.001$ ). Contrarily, after HOSO consumption, Apo B values hardly changed in the normocholesterolemic group and slightly decreased in the hypercholesterolemic group (Figure 2). The small upward trend in Apo B after OPO intake differs from that observed in a postprandial study with OPO [43]. Therefore, further studies would be necessary to clarify the controversial Apo B result observed with OPO in the present study. Regarding Apo A1, there was a positive upward trend after OPO, HOSO and SO intake, without statistical differences among the studied oils (Supplementary Table S2). In contrast, the Apo B/Apo A1 ratio showed significantly different changes ( $p < 0.001$ ), outstanding the increase after SO consumption, versus the decrease with HOSO and OPO in the hypercholesterolemic group (Figure 2). The marked increase after SO, a polyunsaturated fat source, compared to HOSO and OPO, two monounsaturated fats, suggests that the oleic acid present in OPO and HOSO may favorably influence this marker of cardiovascular risk.



**Figure 2.** Values represent the rate of change calculated from [(post-treatment value – pre-treatment value)/pre-treatment value] and the error bars represent standard error of mean (both expressed as percentage). *n* per group: normocholesterolemic: Olive pomace oil (OPO): *n* = 65, high oleic sunflower oil (HOSO): *n* = 34, sunflower oil (SO): *n* = 31; hypercholesterolemic: OPO: *n* = 67, HOSO: *n* = 30, SO: *n* = 37. According to the linear mixed model, the oil effect was significant: (A)  $p = 0.017$ ; (B)  $p = 0.018$ ; (C)  $p < 0.001$ ; (D)  $p < 0.001$ . There were no significant differences between the study groups, neither oil  $\times$  group interaction ( $p > 0.05$ ). Apo: apolipoprotein.

### 3.4. Blood Pressure and Biomarkers of Endothelial Function

At baseline, SBP (from 114.3 to 121.6 mmHg) and DBP results (from 74.2 to 79.5 mmHg) (Baseline characteristics; Table 1) were within the normal range [44], as well as after regular consumption of the tested oils (SBP: 114.5 to 115.8 mmHg; DBP: 78.5 to 77.2 mmHg). Moreover, no significant changes on SBP and DBP were observed with OPO, similarly to HOSO and SO (Supplementary Table S3). The OPO results here observed contrast with those in a study carried out in hypertensive rats after consuming OPO enriched with triterpenic acids (oleanolic and maslinic acids) for 8 weeks, as the animals' high blood pressure was attenuated [10]. Since participants in the present study were normotensive subjects, the question remains whether OPO might have elicited a potential effect on hypertensive patients thanks to its content in triterpenic acids and other minor bioactive components. More studies need to be carried out to better understand the effects of OPO on blood pressure in humans.

On the other hand, numerous studies point to MUFAs in olive oil as key components responsible for the beneficial effects on endothelial function and vascular inflammation [45,46]. This is most relevant considering that the vascular endothelium is involved in regulatory functions of the cardiovascular system, as well as in vascular maintenance and homeostasis [47]. In the present study, to evaluate the effects on endothelial status of the three different vegetable oils studied, the concentration of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), endothelial selectin (E-selectin), platelet selectin (P-selectin), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) was measured (Table 3). Regular consumption of OPO, HOSO and SO for 4 weeks did not show significant changes in any of the biomarkers of endothelial function analyzed ( $p > 0.05$ ) (Table 3). However, regarding eNOS, there was a tendency to increase, particularly after OPO intake (change rate:  $36.8 \pm 15.9$  and  $21.1 \pm 12.1$  in normocholesterolemic and hypercholesterolemic groups, respectively), as well as with HOSO in the hypercholesterolemic group ( $37.5 \pm 16.5$ ), whereas in the healthy group the effect was smaller ( $10.0 \pm 23.7$ ) (Table 3). In contrast, the opposite trend was observed after the SO intervention in both study groups (Table 3). Considering that nitric oxide (NO) is a key factor in vascular regulation due to its vasodilatory action [10], these results support that the presence of MUFAs, such as oleic acid in OPO and HOSO, can positively modulate endothelial function in line with previous studies in humans carried out with the Mediterranean Diet, rich in MUFAs [45,46]. In agreement, animal studies using triterpenic acid-enriched OPO also reported improved endothelial function in both aorta and mesenteric arteries by increasing eNOS expression [10,48]. To sum up, the high oleic acid content in OPO and HOSO seems to have slightly improved endothelial function through the activation of eNOS, and it is likely that in OPO, the content in triterpenic acids might have contributed to this beneficial effect.

Alternatively, P-selectin and E-selectin are adhesion molecules mainly expressed in states of endothelial inflammation, facilitating the movement of monocytes, neutrophils and lymphocytes [49], and thus they play an important role in the pathophysiology of atherosclerosis and endothelial dysfunction [50,51]. According to Table 3, P-selectin and E-selectin values showed an upward trend after HOSO (change rate:  $20.6 \pm 11.2$  normocholesterolemic;  $22.0 \pm 11.2$  hypercholesterolemic) and SO (change rate:  $14.4 \pm 12.3$  normocholesterolemic;  $16.5 \pm 18.7$  hypercholesterolemic) intake, respectively. The increase observed in E-selectin levels, as well as the lower expression of eNOS after SO intake, suggest a lower cardioprotective effect of this oil compared to OPO. However, after the HOSO intervention, the results are somewhat controversial, since eNOS expression increased whereas E-selectin levels decreased ( $-32.7 \pm 11.4$ ) in the healthy subjects, which is not consistent with the increase in P-selectin observed in both groups (Table 3). Therefore, the effects of the studied oils on endothelial function are moderate and not clear with HOSO.

**Table 3.** Effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO) on endothelial function biomarkers.

(%)	Normocholesterolemic			Hypercholesterolemic			p Value
	OPO n = 65	HOSO n = 34	SO n = 31	OPO n = 67	HOSO n = 30	SO n = 37	
eNOS	36.8 ± 15.9	10.0 ± 23.7	-6.7 ± 8.9	21.1 ± 12.1	37.5 ± 16.5	-4.8 ± 11.9	Oil × N/H 0.298
E-selectin	6.3 ± 9.9	-32.7 ± 11.4	14.4 ± 12.3	-1.0 ± 7.8	-2.0 ± 16.8	16.5 ± 18.7	N/H 0.907
P-selectin	9.2 ± 5.6	20.6 ± 11.2	6.9 ± 5.1	4.1 ± 5.2	22.0 ± 11.2	2.9 ± 3.6	Oil 0.726
ICAM-1	-0.8 ± 3.4	2.1 ± 3.6	-1.8 ± 4.4	8.4 ± 5.6	-1.3 ± 6.9	-1.9 ± 5.2	N/H 0.559
VCAM-1	4.5 ± 4.3	6.8 ± 6.9	10.5 ± 8.2	18.0 ± 6.5	0.3 ± 9.9	6.1 ± 9.4	Oil 0.241
							N/H 0.802

Values represent mean ± standard error of mean. The rate of change was calculated from [(post-treatment value) - (pre-treatment value)]/pre-treatment value and expressed as percentage. A linear mixed model was used for data analysis. p-value in the first column represents the treatment effect (OPO, HOSO or SO), in the second column the group effect [normocholesterolemic (N) and hypercholesterolemic (H)], and in the last column the interaction of treatment and group. Significance level was set at  $p < 0.05$ . eNOS: endothelial nitric oxide synthase; E-selectin: endothelial selectin; P-selectin: platelet selectin; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1.

### 3.5. Anthropometric Parameters and Body Composition

Among the anthropometric and bioimpedance determinations carried out to assess the effects of regularly consuming OPO, HOSO and SO on body composition (Table 4), only waist circumference significantly changed ( $p = 0.026$ ), so that a decrease was observed after OPO ( $-0.5 \pm 0.5$  normocholesterolemic;  $-0.8 \pm 0.4$  hypercholesterolemic) and SO ( $-0.8 \pm 0.9$  normocholesterolemic;  $-0.6 \pm 0.8$  hypercholesterolemic) consumption, in contrast to HOSO ( $1.1 \pm 0.9$  normocholesterolemic;  $1.6 \pm 1.3$  hypercholesterolemic; Table 4). Considering that the waist-to-height ratio is better for predicting CVD risk [52], this ratio as well as the waist-to-hip ratio (data not shown) were calculated; however, no significant changes were observed ( $p > 0.05$ ). The favorable effect on waist circumference following OPO intake may be related to the presence of oleanolic and maslinic acids, according to the study carried out in obese mice that lost weight when they were changed to a diet containing OPO enriched in both triterpenic acids for 10 weeks compared to a high-fat diet [12]. This association is also supported by the effects of oleanolic acid on visceral adiposity [53] as well as on body weight [54] in obese murine models. In the present study, the reduction in waist circumference was accompanied by a decreasing trend in visceral fat and weight (without reaching the significance level) in the normocholesterolemic group, and in the hypercholesterolemic to a lower extent (Table 4). Apart from the triterpenic acids, MUFA may have also played a role in these positive effects, as the two oils rich in MUFA (OPO and HOSO) produced positive effects on visceral fat in contrast to SO. This point should be further studied, as part of the present results support the study by Lambert et al. [23], who described that the consumption of 3.9 g/d HOSO for 12 weeks had no significant effect on body fat, waist circumference and waist/hip ratio in healthy subjects; however, the effects on visceral fat observed here are promising.

In relation to SO, previous clinical studies have described that dyslipidemic subjects who substituted their usual oil with SO or canola oil (also rich in PUFA), maintaining their dietary habits, showed no significant changes in weight, BMI, waist circumference and hip circumference after the SO intervention [55]. When SO was consumed as a dietary supplement (3.2 g/d), any statistically significant change in weight, body fat, waist circumference and BMI was observed, although there was a downward trend [56]. The present results match with these studies, as there were no statistical changes in the anthropometric parameters measured, except for the decrease in waist circumference ( $p = 0.026$ ; Table 4), which may be attributed to the higher amount of SO consumed (45 g/d) compared to the latter study 3.2 g/d [56], and likely to the former [52] where the quantity of SO oil consumed was ad libitum.

**Table 4.** Effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO) on anthropometric parameters and body composition.

(%)	Normocholesterolemic				Hypercholesterolemic				p Value
	OPO n = 65	HOSO n = 34	SO n = 31	OPO n = 67	HOSO n = 30	SO n = 37	Oil	N/H	
<b>Weight</b>	-0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.392	0.508	0.715
<b>BMI</b>	-0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.251	0.700	0.421
<b>Body fat</b>	-0.3 ± 1.5	1.8 ± 2.3	-1.0 ± 1.1	2.5 ± 1.5	3.3 ± 3.0	3.8 ± 2.2	0.476	0.064	0.726
<b>Visceral fat</b>	-1.5 ± 2.4	-3.9 ± 2.6	2.2 ± 4.0	-1.1 ± 1.3	-2.9 ± 2.4	6.6 ± 6.1	0.146	0.706	0.953
<b>Waist</b>	-0.5 ± 0.5	1.1 ± 0.9	-0.8 ± 0.9	-0.8 ± 0.4	1.6 ± 1.3	-0.6 ± 0.8	0.026	0.745	0.620
<b>Hip</b>	0.6 ± 0.9	1.1 ± 0.4	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.2	1.2 ± 0.9	0.619	0.615	0.335

Values represent mean ± standard error of mean. The rate of change was calculated from [(post-treatment value - pre-treatment value)/pre-treatment value] and expressed as percentage. A linear mixed model was used for data analysis. P-value in the first column represents the treatment effect (OPO, HOSO or SO), in the second column the group effect [normocholesterolemic (N) and hypercholesterolemic (H)], and in the last column the interaction of treatment and group. Significance level was set at  $p < 0.05$ . BMI: body mass index.

### 3.6. Oxidation and Antioxidant Biomarker Analysis

The role of oxidative stress in the onset and progression of atherosclerosis and its impact on the development of cardiovascular events has been widely described, as many studies associate increased oxidative stress with atherosclerotic risk factors, such as hypertension, dyslipidemia and obesity, among others [57,58]. In the present study, ABTS, ORAC, FRAP, oxLDL and MDA were determined to assess possible changes in oxidative status after the dietary interventions. As shown in Table 5, prolonged consumption of OPO, HOSO and SO did not induce significant changes in ABTS, ORAC, FRAP and oxLDL values in both groups, except for FRAP ( $p = 0.018$ ), which showed differences between the study groups, so that the hypercholesterolemics showed a general greater improvement compared to the normocholesterolemics. FRAP, ORAC and ABTS are three complementary methods commonly used to evaluate the antioxidant capacity of different oils, such as olive or sunflower oil, among others [59], as well as in foods naturally containing or enriched with phenolic compounds, such as hydroxytyrosol in olive oil [60]. Although these techniques have not been applied in previous clinical studies with OPO, HOSO or SO, they have been used in long-term studies carried out with other food products naturally high in antioxidants, rich in phenolic compounds, such as cocoa [61,62], green/roasted coffee [35] or in post-prandial studies with hydroxytyrosol-enriched biscuits [63]. Among these studies, only the regular consumption of the green/roasted coffee mixture, rich in phenols due to the green coffee beans, was associated with increased FRAP and ORAC levels after the intervention. Similarly, the presence of hydroxytyrosol in the enriched biscuits significantly reduced oxLDL levels at 2 and 4 h after intake compared to a control biscuit not containing phenols. Therefore, it is likely that the lack of significant changes in FRAP, ORAC, ABTS and oxLDL observed in the present study is due to the absence of (poly)phenols in the study oils and to the fact that the minor compounds present in the oils did not produce changes in oxidation status.

Nevertheless, the biomarker of oxidative lipid damage, MDA, showed an interaction between the oil and the group ( $p = 0.004$ ; Table 5). According to the Bonferroni test, differences were found in the normocholesterolemic group, with a decrease ( $-4.4 \pm 2.2$ ) and an increase ( $3.1 \pm 3.2$ ) after OPO and HOSO intake, respectively (Table 5). The different behavior between the two sources of monounsaturated fat indicates that certain component(s) of the unsaponifiable fraction of OPO may have exerted the beneficial effects on MDA levels observed. This idea is supported by the outcome in rats with induced myocardial infarction (using isoproterenol); after the administration of maslinic acid (15 mg/kg body weight) for 7 days, the animals showed a reduction in MDA levels [64]. However, the dose of maslinic acid in the present study (0.10 mg/d) provided by the 45 g/d of OPO is far below that used in Hussain et al. [64]. Finally, it should not be disregarded that an antioxidant component in oils with well-recognized protective effects against reactive oxygen species is  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) [13]. Although the intake of this micronutrient was significantly higher after the SO intervention (Table 2), this was not associated with a greater antioxidant capacity after SO intake compared to the other two oils studied. Attending to the Commission Regulation (UE) 432/2012, the three oils evaluated in this study (OPO, HOSO and SO) may be considered as foods high in vitamin E, which is of great interest, as, apart from its essentiality, this nutrient protects cells against oxidative damage (Commission regulation (EC) No 432/2012) [38]. However, due to the similarity in vitamin E content in the study oils (Supplementary Table S1), this nutrient has not led to differences among the oils in antioxidant capacity parameters measured.

**Table 5.** Effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO) on oxidation and antioxidant biomarkers.

(%)	Normocholesterolemic			Hypercholesterolemic			p Value
	OPO n = 65	HOSO n = 34	SO n = 31	OPO n = 67	HOSO n = 30	SO n = 37	
ABTS (µM TE)	11.4 ± 5.8	7.2 ± 3.5	7.6 ± 6.3	2.1 ± 3.4	8.0 ± 2.6	2.4 ± 3.8	0.987
ORAC (µM TE)	3.7 ± 3.0	1.1 ± 6.0	−0.8 ± 3.6	2.9 ± 3.3	18.8 ± 10.7	1.4 ± 3.6	0.210
FRAP (µM TE)	4.0 ± 1.7	7.6 ± 3.4	2.7 ± 2.6	2.1 ± 1.8	1.5 ± 2.8	−2.6 ± 1.6	0.018
oxLDL (ng/mL)	15.0 ± 7.8	10.5 ± 9.4	1.5 ± 7.6	5.5 ± 9.7	16.4 ± 11.3	2.5 ± 5.1	0.746
MDA (nmol/mL)	−4.4 ± 2.2 <sup>a</sup>	3.1 ± 3.2 <sup>b</sup>	0.7 ± 2.9 <sup>ab</sup>	0.1 ± 2.0	−8.4 ± 4.7	−1.4 ± 2.9	0.140

Values represent mean ± standard error of mean. The rate of change was calculated from [(post-treatment value) − (pre-treatment value)]/pre-treatment value and expressed as percentage. A linear mixed model was used for data analysis. p-value in the first column represents the treatment effect (OPO, HOSO or SO), in the second column the group effect [normocholesterolemic (N) and hypercholesterolemic (H)], and in the last column the interaction of treatment and group. Significance level was set at  $p < 0.05$ . ABTS: free radical 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-scavenging capacity. ORAC: oxygen radical absorbance capacity. FRAP: ferric reducing/antioxidant power. MDA: malondialdehyde. TE: Trolox equivalents. oxLDL: Oxidised low density lipoprotein. Superscripts correspond to significant differences within the normocholesterolemic (N) or hypercholesterolemic (H) group according to the Bonferroni test.

### 3.7. Strengths and Limitations

The present work has some limitations: the oils used in the run-in and wash-out phases in Study 1 (SO) and Study 2 (CO) had a similar but not identical fatty profile. Nevertheless, the chemical composition of SO and CO was quite similar (Supplementary Table S1). In order to assess whether SO and CO induced differences in initial (pre-treatment) values, we statistically analysed this data and did not observe differences. In addition, we used rates of change to minimize any possible differences in the initial values due to the use of SO or CO, and focused on the changes induced by OPO consumption. Another limitation was that, although the presentation of the oils was with the same bottle format for blinding, given the familiarity with sunflower oil, it is likely that the participants knew the type of oil they were consuming. However, important strengths are identified: the study design was robust, and a large number of parameters related to cardiovascular disease and associated comorbidities were analyzed, thus providing considerable information on the health effects of OPO, HOSO, and SO. In addition, the number of participants (*n*) was within the range established according to the power calculations.

### 4. Conclusions

When comparatively studying the effects of regularly consuming OPO, HOSO and SO (45 g/d), only OPO produced beneficial effects on cardiovascular health, as T-C, LDL-C and waist circumference are reduced in both healthy and hypercholesterolemic subjects. In addition, serum lipid oxidation in the healthy group is lowered. All these findings are in line with previous *in vitro* or preclinical studies developed with the OPO or some of its components. However, the aforementioned positive cardiovascular effects of OPO are not supported by changes in Apo B levels in both groups and the Apo B/Apo A1 ratio in the normocholesterolemic participants. Taken together, it may be concluded that OPO is a healthier alternative than HOSO and SO for healthy and cardiovascular risk people.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods11152186/s1>. Table S1. Chemical composition of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO), sunflower oil (SO) and corn oil (CO). Table S2. Effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO) on biochemical parameters; Table S3. Effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO) on blood pressure.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.M., L.B.-C. and B.S.; methodology, S.G.-R., M.A.S., B.S., R.M. and L.B.-C.; software, S.G.-R., M.A.S. and J.G.-C.; validation, R.M., L.B.-C. and B.S.; formal analysis, S.G.-R., M.A.S., J.G.-C. and B.S.; investigation, S.G.-R., M.A.S., J.G.-C., B.S., R.M. and L.B.-C.; resources, R.M., L.B.-C. and B.S.; data curation, S.G.-R., M.A.S. and J.G.-C.; writing—original draft preparation, S.G.-R. and B.S.; writing—review and editing, S.G.-R., B.S., R.M. and L.B.-C.; visualization, S.G.-R., M.A.S., J.G.-C., B.S., R.M. and L.B.-C.; supervision, B.S., R.M. and L.B.-C.; project administration, R.M., B.S. and L.B.-C.; funding acquisition, R.M. and L.B.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Interprofesional del Aceite de Orujo de Oliva (ORIVA) financed the study and the predoctoral contract of SG-R. Community of Madrid partly financed the predoctoral contracts of JG-C (PEJD-2017-PRE/BIO-4225) and MAS (PEJD-2018-PRE/SAL-9104). No other conflicts of interests are declared. ORIVA had no part on the design, conductance, analysis or interpretation of results.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda (protocol code PI 158/17, date of approval 26 February 2018, study 1, and PI 110/19, date of approval 22 July 2019, study 2) and the Bioethics Committee of CSIC.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy concerns.

**Acknowledgments:** The authors thank the volunteers for their participation in the study and Laura Barrios for her statistical advice and Mónica Redondo-Puente for her help with the statistical and experimental analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Aranceta, J.; Pérez-Rodrigo, C. Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: A systematic review. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, S8–S22. [CrossRef] [PubMed]
2. Julibert, A.; Bibiloni, M.D.M.; Mateos, D.; Angullo, E.; Tur, J.A. Dietary fat intake and metabolic syndrome in older adults. *Nutrients* **2019**, *11*, 1901. [CrossRef] [PubMed]
3. Guasch-Ferré, M.; Hu, F.B.; Martínez-González, M.A.; Fitó, M.; Bulló, M.; Estruch, R.; Ros, E.; Corella, D.; Recondo, J.; Gómez-Gracia, E.; et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* **2014**, *12*, 78. [CrossRef] [PubMed]
4. Beulen, Y.; Martínez-González, M.A.; Van de Rest, O.; Salas-Salvadó, J.; Sorlí, J.V.; Gómez-Gracia, E.; Fiol, M.; Estruch, R.; Santos-Lozano, J.M.; Schröder, H.; et al. Quality of dietary fat intake and body weight and obesity in a Mediterranean population: Secondary analyses within the PREDIMED trial. *Nutrients* **2018**, *10*, 2011. [CrossRef]
5. Nocella, C.; Cammisotto, V.; Fianchini, L.; D’Amico, A.; Novo, M.; Castellani, V.; Stefanini, L.; Violi, F.; Carnevale, R. Extra virgin olive oil and cardiovascular diseases: Benefits for human health. *Endoc. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2018**, *18*, 4–13. [CrossRef]
6. Marcelino, G.; Hiane, P.A.; Freitas, K.C.; Santana, L.F.; Pott, A.; Donadon, J.R.; Guimarães, R. Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota. *Nutrients* **2019**, *11*, 1826. [CrossRef]
7. Yubero-Serrano, E.M.; Lopez-Moreno, J.; Gomez-Delgado, F.; Lopez-Miranda, J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, *72*, 8–17. [CrossRef]
8. Romani, A.; Ieri, F.; Urciuoli, S.; Noce, A.; Marrone, G.; Nediani, C.; Bernini, R. Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients* **2019**, *11*, 1776. [CrossRef]
9. Sánchez-Moral, P.; Ruiz-Méndez, M.V. Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites* **2006**, *57*, 47–55. [CrossRef]
10. Valero-Muñoz, M.; Martín-Fernández, B.; Ballesteros, S.; De la Fuente, E.; Quintela, J.C.; Lahera, V.; Heras, N.D.L. Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: Mechanisms involved. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 376–383. [CrossRef]
11. Rodríguez-Rodríguez, R. Oleoanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1414–1425. [CrossRef]
12. Claro-Cala, C.M.; Quintela, J.C.; Pérez-Montero, M.; Miñano, J.; De Sotomayor, M.A.; Herrera, M.D.; Rodríguez-Rodríguez, A.R. Pomace olive oil concentrated in triterpenic acids restores vascular function, glucose tolerance and obesity progression in mice. *Nutrients* **2020**, *12*, 323. [CrossRef]
13. Mateos, R.; Sarriá, B.; Bravo, L. Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 3506–3521. [CrossRef]
14. Lee, W.; Yang, E.J.; Ku, S.K.; Song, K.S.; Bae, J.S. Anti-inflammatory effects of oleoanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Inflammation* **2013**, *36*, 94–102. [CrossRef]
15. Ampofo, E.; Berg, J.J.; Menger, M.D.; Laschke, M.W. Maslinic acid alleviates ischemia/reperfusion-induced inflammation by downregulation of NFκB-mediated adhesion molecule expression. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6119. [CrossRef]
16. Fernández-Aparicio, A.; Schmidt-RioValle, J.; Perona, J.S.; Correa-Rodríguez, M.; Castellano, J.M.; González-Jiménez, E. Potential protective effect of oleoanolic acid on the components of metabolic syndrome: A systematic review. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1294. [CrossRef]
17. Murcia, J.L. Aceites de Semillas: Palma, Colza, Soja y Girasol Lideran la Producción y el Consumo Mundial. Available online: [https://www.mercasa.es/media/publicaciones/58/pag\\_065-070\\_Murcia.pdf](https://www.mercasa.es/media/publicaciones/58/pag_065-070_Murcia.pdf) (accessed on 4 May 2022).
18. Alsina, E.; Macri, E.V.; Zago, V.; Schreier, L.; Friedman, S.M. Aceite de girasol alto oleico: Hacia la construcción de una grasa saludable. *Actual Nutr.* **2015**, *16*, 114–121.
19. Holgado, F.; Ruiz-Méndez, M.V.; Velasco, J.; Márquez-Ruiz, G. Performance of olive-pomace oils in discontinuous and continuous frying. Comparative behavior with sunflower oils and high-oleic sunflower oils. *Foods* **2021**, *10*, 3081. [CrossRef]
20. Vijayakumar, M.; Vasudevan, D.M.; Sundaram, K.R.; Krishnan, S.; Vaidyanathan, K.; Nandakumar, S.; Chandrasekhar, R.; Mathew, N. A randomized study of coconut oil versus sunflower oil on cardiovascular risk factors in patients with stable coronary heart disease. *Indian Heart J.* **2016**, *68*, 498–506. [CrossRef]
21. Yahay, M.; Heidari, Z.; Allameh, Z.; Amani, R. The effects of canola and olive oils consumption compared to sunflower oil, on lipid profile and hepatic steatosis in women with polycystic ovarian syndrome: A randomized controlled trial. *Lipids Health Dis.* **2021**, *20*, 7. [CrossRef]
22. Akrami, A.; Nikaein, F.; Babajafari, S.; Faghieh, S.; Yarmohammadi, H. Comparison of the effects of flaxseed oil and sunflower seed oil consumption on serum glucose, lipid profile, blood pressure, and lipid peroxidation in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Lipidol.* **2018**, *12*, 70–77. [CrossRef] [PubMed]

23. Lambert, E.V.; Goedecke, J.; Bluett, K.; Heggie, K.; Claassen, A.; Rae, D.; West, S.; Dugas, J.; Dugas, L.; Meltzer, S.; et al. Conjugated linoleic acid versus high-oleic acid sunflower oil: Effects on energy metabolism, glucose tolerance, blood lipids, appetite and body composition in regularly exercising individuals. *Br. J. Nutr.* **2007**, *97*, 1001–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pérez-Camino, M.C.; Cert, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1558–1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Giacometti, J. Determination of aliphatic alcohols, squalene, alpha-tocopherol and sterols in olive oils: Direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst* **2001**, *126*, 472–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Ríos, J.J.; León-Camacho, M.; Alcudia, F.; Cert, A. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2185–2192. [[CrossRef](#)]
27. Friedewald, W.T.; Levy, R.I.; Fredrickson, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **1972**, *18*, 499–502. [[CrossRef](#)]
28. Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 757–781. [[CrossRef](#)]
29. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Prior, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4437–4444. [[CrossRef](#)]
30. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)]
31. Mateos, R.; Lecumberri, E.; Ramos, S.; Goya, L.; Bravo, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J. Chromatogr. B* **2005**, *827*, 76–82.
32. Moreiras, O.; Carbajal, A.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. *Ingestas Diarias Recomendadas de Energía y Nutrientes Para la Población Española: Tablas de Composición de Alimentos*, 18th ed.; Pirámide (Grupo Anaya, SA): Madrid, Spain, 2016; pp. 27–44.
33. Da Silva, R.; Bach-Faig, A.; Quintana, B.R.; Buckland, G.; De Almeida, M.D.V.; Serra-Majem, L. Worldwide variation of adherence to the Mediterranean diet, in 1961–1965 and 2000–2003. *Public Health Nutr.* **2009**, *12*, 1676–1684. [[CrossRef](#)]
34. Vilarnau, C.; Stracker, D.M.; Funtikov, A.; Da Silva, R.; Estruch, R.; Bach-Faig, A. Worldwide adherence to Mediterranean Diet between 1960 and 2011. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, *72*, 83–91. [[CrossRef](#)]
35. Martínez-López, S.; Sarriá, B.; Mateos, R.; Bravo-Clemente, L. Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: Results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 865–878. [[CrossRef](#)]
36. European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the council. *Off. J. Eur. Union* **2011**, *L304*, 18–63.
37. Luo, H.Q.; Shen, J.; Chen, C.P.; Ma, X.; Lin, C.; Ouyang, Q.; Xuan, C.X.; Liu, J.; Sun, H.B.; Liu, J. Lipid-lowering effects of oleanolic acid in hyperlipidemic patients. *Chin. J. Nat. Med.* **2018**, *16*, 339–346. [[CrossRef](#)]
38. European Commission. Commission Regulation (EC) No 432/2012. *Off. J. Eur. Union* **2012**, *L136*, 1–40.
39. Hamed-Kalajahi, F.; Zarezadeh, M.; Dehghani, A.; Musazadeh, V.; Kolahi, A.; Shabbidar, S.; Djafarian, K. A systematic review and meta-analysis on the impact of oral vitamin E supplementation on apolipoproteins A1 and B100. *Clin. Nutr. ESPEN* **2021**, *46*, 106–114. [[CrossRef](#)]
40. Sniderman, A.D.; Thanassoulis, G.; Glavinovic, T.; Navar, A.M.; Pencina, M.; Catapano, A.; Ference, B.A. Apolipoprotein B particles and cardiovascular disease: A narrative review. *JAMA Cardiol.* **2019**, *4*, 1287–1295. [[CrossRef](#)]
41. Lima, L.M.; Carvalho, M.D.G.; Sousa, M.O. Apo B/apo AI ratio and cardiovascular risk prediction. *Arq. Bras. Cardiol.* **2007**, *88*, e187–e190. [[CrossRef](#)]
42. Sato, Y.; Fujimoto, S.; Toida, T.; Nakagawa, H.; Yamashita, Y.; Iwakiri, T.; Fukuda, A.; Iwatsubo, S. Apoprotein B/Apoprotein A-1 ratio and mortality among prevalent dialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *11*, 840–846. [[CrossRef](#)]
43. Cabello-Moruno, R.; Martínez-Force, E.; Montero, E.; Perona, J.S. Minor components of olive oil facilitate the triglyceride clearance from postprandial lipoproteins in a polarity-dependent manner in healthy men. *Nutr. Res.* **2014**, *34*, 40–47. [[CrossRef](#)]
44. De la Sierra, A. New American and European Hypertension Guidelines, reconciling the differences. *Cardiol. Ther.* **2019**, *8*, 157–166. [[CrossRef](#)]
45. Esposito, K.; Marfella, R.; Ciotola, M.; Di Palo, C.; Giugliano, F.; Giugliano, G.; D’Armiento, M.; D’Andrea, F.; Giugliano, D. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: A randomized trial. *JAMA* **2004**, *292*, 1440–1446. [[CrossRef](#)]
46. Yubero-Serrano, E.M.; Fernandez-Gandara, C.; Garcia-Rios, A.; Rangel-Zuñiga, O.A.; Gutierrez-Mariscal, F.M.; Torres-Peña, J.D.; Marin, C.; Lopez-Moreno, J.; Castaño, J.P.; Delgado-Lista, J.; et al. Mediterranean diet and endothelial function in patients with coronary heart disease: An analysis of the CORDIOPREV randomized controlled trial. *PLoS Med.* **2020**, *17*, e1003282. [[CrossRef](#)]
47. Godo, S.; Shimokawa, H. Endothelial functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, e108–e114. [[CrossRef](#)]
48. Rodríguez-Rodríguez, R.; Herrera, M.D.; De Sotomayor, M.A.; Ruiz-Gutiérrez, V. Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 1435–1444. [[CrossRef](#)]

49. Salazar-Exaire, J.D.; Reyes-Martínez, R.I.; González-Álvarez, R.; Briones-Garduño, J.C. P-selectina como marcador de reactividad endotelial en pacientes con preeclampsia. *Cirugía Cir.* **2004**, *72*, 121–124.
50. Zinellu, A.; Mangoni, A.A. Systematic review and meta-analysis of the effect of statins on circulating E-selectin, L-selectin, and P-selectin. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1707. [[CrossRef](#)]
51. Theofilis, P.; Sagris, M.; Oikonomou, E.; Antonopoulos, A.S.; Siasos, G.; Tsioufis, C.; Tousoulis, D. Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction. *Biomedicines* **2021**, *9*, 781. [[CrossRef](#)]
52. Ashwell, M.; Gunn, P.; Gibson, S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: Systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* **2012**, *13*, 275–286. [[CrossRef](#)]
53. De Melo, C.L.; Queiroz, M.G.; Fonseca, S.G.; Bizerra, A.M.; Lemos, T.L.; Melo, T.S.; Santos, F.A.; Rao, V.S. Oleonic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *185*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Djeziri, F.Z.; Belarbi, M.; Murtaza, B.; Hichami, A.; Benammar, C.; Khan, N.A. Oleonic acid improves diet-induced obesity by modulating fat preference and inflammation in mice. *Biochimie* **2018**, *152*, 110–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Saedi, S.; Noroozi, M.; Khosrotabar, N.; Mazandarani, S.; Ghadrdoost, B. How canola and sunflower oils affect lipid profile and anthropometric parameters of participants with dyslipidemia. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **2017**, *31*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chang, H.; Gan, W.; Liao, X.; Wei, J.; Lu, M.; Chen, H.; Wang, S.; Ma, Y.; Wu, Q.; Yu, Y.; et al. Conjugated linoleic acid supplements preserve muscle in high-body-fat adults: A double-blind, randomized, placebo trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2020**, *30*, 1777–1784. [[CrossRef](#)]
57. Pastori, D.; Carnevale, R.; Pignatelli, P. Is there a clinical role for oxidative stress biomarkers in atherosclerotic diseases? *Intern. Emerg. Med.* **2014**, *9*, 123–131. [[CrossRef](#)]
58. Pignatelli, P.; Menichelli, D.; Pastori, D.; Violi, F. Oxidative stress and cardiovascular disease: New insights. *Kardiol. Pol.* **2018**, *76*, 713–722. [[CrossRef](#)]
59. Cheung, S.C.; Szeto, Y.T.; Benzie, I.F. Antioxidant protection of edible oils. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2007**, *62*, 39–42. [[CrossRef](#)]
60. Ramos-Escudero, F.; Morales, M.T.; Asuero, A.G. Characterization of bioactive compounds from monovarietal virgin olive oils: Relationship between phenolic compounds-antioxidant capacities. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 348–358. [[CrossRef](#)]
61. Sarriá, B.; Martínez-López, S.; Sierra-Cinos, J.L.; García-Diz, L.; Mateos, R.; Bravo, L. Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 122–134. [[CrossRef](#)]
62. Martínez-López, S.; Sarriá, B.; Sierra-Cinos, J.L.; Goya, L.; Mateos, R.; Bravo, L. Realistic intake of a flavanol-rich soluble cocoa product increases HDL-cholesterol without inducing anthropometric changes in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects. *Food Funct.* **2014**, *5*, 364–374. [[CrossRef](#)]
63. Mateos, R.; Martínez-López, S.; Baeza Arévalo, G.; Amigo-Benavent, M.; Sarriá, B.; Bravo-Clemente, L. Hydroxytyrosol in functional hydroxytyrosol-enriched biscuits is highly bioavailable and decreases oxidised low density lipoprotein levels in humans. *Food Chem.* **2016**, *205*, 248–256. [[CrossRef](#)]
64. Hussain-Shaik, A.; Rasool, S.N.; Abdul Kareem, M.; Krushna, G.S.; Akhtar, P.M.; Devi, K.L. Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J. Med. Food* **2012**, *15*, 741–746. [[CrossRef](#)]

**Table S1.** Effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO) on biochemical parameters.

(%)	Normocholesterolemic			Hypercholesterolemic			<i>p</i> value		
	OPO <i>n</i> =65	HOSO <i>n</i> =34	SO <i>n</i> =31	OPO <i>n</i> =67	HOSO <i>n</i> =30	SO <i>n</i> =37	Oil	N/H	Oil* N/H
<b>Total cholesterol</b>	-1.4 ± 1.2	4.9 ± 2.0	1.1 ± 1.8	-0.3 ± 1.0	2.2 ± 2.0	-0.1 ± 1.6	0.017	0.479	0.420
<b>Triglycerides</b>	-1.5 ± 2.9	10.4 ± 6.1	-1.8 ± 5.0	13.8 ± 9.1	4.5 ± 7.0	6.9 ± 5.7	0.707	0.955	0.314
<b>HDL-cholesterol</b>	0.4 ± 1.3	2.3 ± 1.8	0.8 ± 2.2	2.4 ± 1.5	3.3 ± 2.1	-2.0 ± 1.9	0.094	0.958	0.468
<b>LDL-cholesterol</b>	-1.6 ± 1.8	4.2 ± 2.2	3.4 ± 2.8	-1.3 ± 1.4	4.1 ± 3.5	1.0 ± 2.2	0.018	0.643	0.892
<b>VLDL-cholesterol</b>	-2.6 ± 3.1	11.1 ± 6.2	-2.9 ± 4.7	13.8 ± 9.4	3.7 ± 7.0	5.7 ± 5.8	0.658	0.920	0.237
<b>Apo A1</b>	0.5 ± 1.2	1.9 ± 1.6	2.9 ± 1.7	3.5 ± 1.0	1.2 ± 1.7	1.0 ± 1.3	0.969	0.901	0.132
<b>Apo B</b>	2.7 ± 1.6	0.7 ± 2.2	9.5 ± 2.3	1.7 ± 1.6	-0.5 ± 2.5	9.0 ± 1.9	<0.001	0.640	0.965
<b>Apo B / Apo A1</b>	1.4 ± 2.0	-2.5 ± 2.6	6.3 ± 2.7	-1.2 ± 2.2	-2.0 ± 2.6	11.3 ± 2.6	<0.001	0.726	0.303
<b>LDL/HDL</b>	-1.1 ± 2.1	3.0 ± 2.8	4.3 ± 3.7	-2.2 ± 1.9	1.7 ± 3.7	4.3 ± 3.0	0.056	0.731	0.971
<b>CT/HDL</b>	-1.3 ± 1.2	1.8 ± 1.7	1.3 ± 2.2	-1.6 ± 1.3	-0.5 ± 2.1	2.9 ± 2.0	0.089	0.694	0.595

Values represent mean ± standard error of mean. The rate of change was calculated from [(post-treatment value – pre-treatment value)/pre-treatment value] and expressed as percentage. A linear mixed model was used for data analysis. *p*-value in the first column represents the treatment effect (OPO, HOSO or SO), in the second column the group effect [normocholesterolemic (N) and hypercholesterolemic (H)], and in the last column the interaction of treatment and group. Significance level was set at *p*<0.05. Apo: apolipoprotein.

**Table S2.** Effects of olive pomace oil (OPO), high oleic sunflower oil (HOSO) and sunflower oil (SO) on blood pressure.

(%)	Normocholesterolemic			Hypercholesterolemic			<i>p</i> value		
	OPO <i>n</i> =65	HOSO <i>n</i> =34	SO <i>n</i> =31	OPO <i>n</i> =67	HOSO <i>n</i> =30	SO <i>n</i> =37	Oil	N/H	Oil* N/H
<b>Systolic BP</b>	-0.1 ± 0.6	-2.0 ± 1.2	-0.5 ± 0.9	-0.4 ± 0.7	-0.4 ± 1.4	-0.1 ± 1.2	0.532	0.478	0.587
<b>Diastolic BP</b>	-0.4 ± 1.0	-1.0 ± 1.6	0.0 ± 1.2	0.1 ± 0.8	3.3 ± 1.9	-0.5 ± 1.1	0.652	0.148	0.212

Values represent mean ± standard error of mean. The rate of change was calculated from [(post-treatment value – pre-treatment value)/pre-treatment value] and expressed as percentage. A linear mixed model was used for data analysis. *p*-value in the first column represents the treatment effect (OPO, HOSO or SO), in the second column the group effect [normocholesterolemic (N) and hypercholesterolemic (H)], and in the last column the interaction of treatment and group. Significance level was set at *p*<0.05.

### 3.3. Resultados no publicados

#### 3.3.1. Efecto de la intervención nutricional sobre marcadores de diabetes y obesidad.

Para conocer el efecto del consumo prolongado del AOO, AGAO y AG sobre marcadores relacionados con la diabetes, se evaluaron diferentes parámetros asociados con la resistencia a la insulina y la homeostasis glucídica. De acuerdo con el modelo lineal mixto aplicado sobre las tasas de cambio (Tabla 5), la glucosa y la Hb1Ac en ayunas no mostraron cambios estadísticamente significativos por efecto del producto (AOO, AGAO y AG) en ambos grupos de población. No sucedió lo mismo con los valores de insulina que, de acuerdo a la Tabla 5, mostraron cambios significativos por efecto de la intervención dietética ( $p=0,004$ ) y por efecto de pertenecer a un grupo u otro ( $p=0,003$ ). De esta forma, se observó un descenso en la concentración de insulina tras la ingesta de AOO y AG, así como un aumento tras la ingesta de AGAO en el grupo de sujetos sanos. Para el grupo hipercolesterolémico, la concentración de insulina en suero mostró una tendencia ascendente tras la intervención con los tres tipos de aceite, resultando en diferencias no sólo por el producto sino también por el grupo. La disminución del 9,6% en la tasa de cambio de los valores de insulina tras el consumo prolongado de AOO en el grupo de sujetos sanos reforzó lo observado en ensayos *in vivo* en diversos modelos animales tras la administración oral de ácidos triterpénicos (ácidos ursólico u oleanólico), así como tras el consumo de AOO enriquecido en ácido oleanólico y ácido maslínico, presentes de manera natural en altas concentraciones en este aceite (de Melo y cols., 2010; Wang y cols., 2013; Claro-Cala y cols., 2020; González-Garibay y cols., 2020). Del mismo modo, un reciente ensayo clínico realizado por Santos-Lozano y cols. (2019) observó cómo el consumo de aceite de oliva enriquecido con ácido oleanólico reducía el riesgo de desarrollar diabetes en pacientes prediabéticos, disminuyendo la incidencia de DM2 tras 30 meses de consumo del aceite enriquecido. Por lo tanto, sería interesante el desarrollo de futuras investigaciones con AOO, naturalmente rico en estos compuestos triterpénicos, tanto en una población sana como diabética o prediabética, incluso con AOO enriquecido en estos compuestos bioactivos para comprobar si, además de lo observado en la presente Tesis Doctoral, otros biomarcadores como la glucosa o la Hb1Ac se ven modificados en sujetos de riesgo o con la enfermedad ya establecida.

Con respecto al AG, ensayos clínicos llevados a cabo en sujetos con síndrome metabólico no observaron cambios en los niveles de glucosa e insulina tras el consumo diario de 25 mL (Akrami y cols., 2018) y 30 mL (Farajbakhsh y cols., 2019) de AG durante 7 y 8 semanas, respectivamente. Lo mismo sucedió cuando el AGAO (3,9 g/día) fue comparado con el ácido linoleico conjugado (3,9 g/día) en 62 sujetos sanos, no observándose tampoco cambios en las concentraciones de glucosa en sangre (Lambert y cols., 2007). A este respecto es importante señalar que en los citados estudios la cantidad de aceite administrada fue inferior a la aportada en los dos ensayos clínicos (45 g/día) descritos en la presente Tesis Doctoral. Por ello, es posible que la cantidad ingerida haya contribuido a que parámetros como la insulina se hayan visto modificadas por efecto del producto.

## Resultados

Tabla 5. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva (AOO), aceite de girasol alto oleico (AGAO) y aceite de girasol (AG) en la glicemia, la insulinemia, la concentración de hemoglobina glicosilada (HbA1c), los índices de resistencia/sensibilidad a la insulina (HOMA-IR/QUICKI) y en la función beta pancreática (HOMA-β).

	Normocolesterolémicos (n=65)			Hipercolesterolémicos (n=67)			<i>p value</i>		
	AOO	AGAO	AG	AOO	AGAO	AG	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>Glucosa (mg/dL)</b>									
Inicial	79,4 ± 0,8	79,4 ± 1,4	81,5 ± 1,1	82,4 ± 1,1	80,8 ± 1,6	80,9 ± 1,6	-	-	-
Final	79,5 ± 0,9	79,8 ± 1,2	79,4 ± 1,5	82,2 ± 1,1	80,9 ± 1,5	83,2 ± 1,5	-	-	-
Tasa de cambio	0,4 ± 1,0	0,9 ± 1,6	-2,6 ± 1,3	0,1 ± 1,1	0,8 ± 1,8	3,1 ± 1,3	0,886		0,408
<b>HbA1c (%)</b>									
Inicial	5,4 ± 0,0	5,53 ± 0,04	5,33 ± 0,04	5,4 ± 0,0	5,48 ± 0,04	5,36 ± 0,04	-	-	-
Final	5,3 ± 0,0	5,38 ± 0,10	5,29 ± 0,04	5,4 ± 0,0	5,46 ± 0,04	5,32 ± 0,04	-	-	-
Tasa de cambio	-1,0 ± 1,0	-2,7 ± 1,7	0,6 ± 0,6	0,0 ± 0,3	-0,3 ± 0,6	-0,8 ± 0,4	0,623	0,145	0,411
<b>Insulina (μUI/mL)</b>									
Inicial	7,6 ± 0,5	6,9 ± 0,5	8,3 ± 0,8	8,9 ± 0,9	7,3 ± 0,7	8,5 ± 1,0	-	-	-
Final	6,4 ± 0,4	7,6 ± 0,6	6,8 ± 0,7	8,2 ± 0,6	8,0 ± 0,8	9,1 ± 1,3	-	-	-
Tasa de cambio	-9,6 ± 4,2	12,7 ± 4,9	-12,5 ± 5,6	6,1 ± 5,6	21,3 ± 9,7	8,8 ± 5,9	0,004	0,003	0,651

Continuación Tabla 5.

	Normocolesterolémicos (n=65)			Hipercolesterolémicos (n=67)			<i>p value</i>		
	AOO	AGAO	AG	AOO	AGAO	AG	Aceite	N/H	N/H <sup>x</sup> Aceite
<b>HOMA-IR</b>									
Inicial	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	-	-	-
Final	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,9 ± 0,3	-	-	-
Tasa de cambio	-8,5 ± 4,6	13,9 ± 5,3	-14,3 ± 5,8	8,4 ± 6,7	22,0 ± 10,1	12,4 ± 6,2	0,015	0,003	0,472
<b>HOMA-β</b>									
Inicial	204,5 ± 22,3	187,4 ± 23,9	191,5 ± 27,0	175,0 ± 13,3	195,5 ± 37,6	140,3 ± 39,5	-	-	-
Final	183,9 ± 25,7	221,9 ± 38,1	185,2 ± 43,2	189,9 ± 17,8	202,8 ± 31,1	165,9 ± 16,4	-	-	-
Tasa de cambio	6,7 ± 10,1	18,6 ± 18,9	4,9 ± 15,0	27,6 ± 19,5	41,1 ± 24,8	-1,7 ± 6,9	0,231	0,294	0,629
<b>QUICKI</b>									
Inicial	0,369 ± 0,004	0,371 ± 0,005	0,363 ± 0,005	0,365 ± 0,005	0,375 ± 0,009	0,365 ± 0,006	-	-	-
Final	0,382 ± 0,005	0,366 ± 0,004	0,376 ± 0,006	0,366 ± 0,005	0,366 ± 0,006	0,363 ± 0,007	-	-	-
Tasa de cambio	3,5 ± 1,1	-4,3 ± 3,0	3,9 ± 1,2	-0,6 ± 0,9	-1,9 ± 1,2	-0,7 ± 0,9	0,049	0,110	0,074

Los valores representan la media ± SEM. La tabla muestra los valores medios iniciales (pretratamiento) y finales (postratamiento). La tasa de cambio se calculó a partir de los valores iniciales y finales como [(valor final-valor inicial)/valor inicial] y se expresó como porcentaje. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal mixto. Los valores *p* de la primera columna corresponden al efecto de tomar el aceite (aceite de orujo de oliva -AOO-, aceite de girasol alto oleico -AGAO- o aceite de girasol -AG-), los de la penúltima columna al efecto del grupo [normocolesterolémico (N) o hipercolesterolémico (H)], y la última columna a la interacción del aceite y el grupo. El nivel de significación se fijó en *p*<0,05. HbA1c: hemoglobina glicosilada; HOMA-IR: modelo homeostático para valorar la resistencia a la insulina; HOMA-β: modelo homeostático para valorar la funcionalidad de las células β pancreáticas; QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index

Los modelos matemáticos propuestos por Matthews y cols. (1985) fueron calculados para evaluar la resistencia a la insulina y para conocer la actividad de las células beta pancreáticas tras la ingesta de AOO, AG y AGAO. Según muestra la Tabla 5, el índice HOMA-IR mostró cambios estadísticamente significativos por efecto del aceite (AOO, AGAO y AG) ( $p=0,015$ ) y por efecto del grupo (normocolesterolémico e hipercolesterolémico) ( $p=0,003$ ). Atendiendo a las tasas de cambio, se observó una menor resistencia a la insulina (HOMA-IR) en el grupo de sujetos sanos tras la intervención con el AOO y el AG. Este efecto beneficioso sobre el índice HOMA-IR tras el consumo de una grasa monoinsaturada (AOO) y poliinsaturada (AG) estarían parcialmente en consonancia con lo observado en un reciente ensayo clínico desarrollado en mujeres con síndrome de ovario poliquístico, donde el índice HOMA-IR sólo disminuyó significativamente tras el consumo de aceite de oliva y de canola (fuentes de ácidos grasos monoinsaturados, AGM) y no tras la intervención dietética con AG (fuente de ácidos grasos poliinsaturados) (Yahay y cols., 2021).

El índice QUICKI también reflejó variaciones significativas como consecuencia del consumo prolongado de AOO, AGAO y AG ( $p=0,045$ ). De acuerdo con los datos reportados en la Tabla 5, el índice QUICKI aumentó sólo en el grupo normocolesterolémico tras la ingesta de AOO y AG, en concordancia con el descenso observado en el índice HOMA-IR. Si consideramos que este índice informa de la sensibilidad a la insulina, el aumento inducido por el AOO y el AG en sujetos sanos es favorable. Finalmente, no se observaron diferencias en los valores de HOMA- $\beta$  con ninguno de los aceites estudiados.

Además de los biomarcadores citados anteriormente, en la presente Tesis Doctoral se analizaron otros parámetros estrechamente relacionados con la diabetes y la obesidad. Como se muestra en la Figura 21, la insulina (determinada por la técnica Múltiplex) y el glucagón no mostraron variaciones significativas por efecto del tratamiento dietético (AOO, AGAO y AG). Ahora bien, cuando el grupo de sujetos sanos fue comparado con el grupo de sujetos hipercolesterolémicos se observaron diferencias en los valores de insulina ( $p=0,002$ ). Atendiendo a las tasas de cambio, este parámetro aumentó en el grupo de riesgo. Dado que la hipercolesterolemia no es un factor de riesgo independiente sino que está ligada a otras patologías como la diabetes o la obesidad (Xi y cols., 2020b), estos niveles de colesterol moderadamente elevados en el grupo hipercolesterolémico podrían

justificar que estuvieran acompañados de niveles ligeramente superiores de insulina, sin alcanzar valores de riesgo. Otro de los biomarcadores empleados en la práctica clínica, en particular para diferenciar la DM1 de la DM2, es la determinación del péptido C (Pineda, 2015). Como muestra la Figura 21, el consumo de AOO, AGAO y AG durante 4 semanas no provocó cambios estadísticamente significativos sobre los niveles de péptido C.

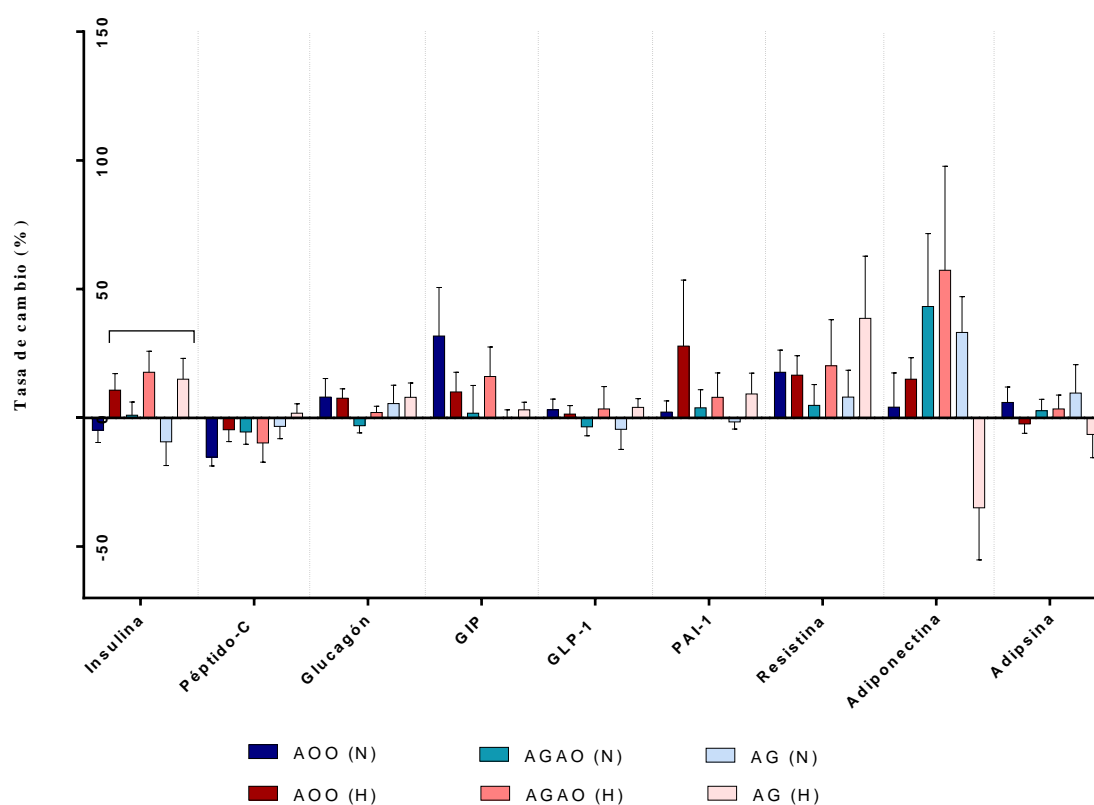


Figura 21. Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en biomarcadores de obesidad y diabetes.

Los valores representan la tasa de cambio calculada a partir de  $[(\text{valor post-tratamiento}) - (\text{valor pretratamiento}) / \text{valor pretratamiento}]$  y las barras de error representan el error estándar de la media, SEM (ambos expresados como porcentaje). Los datos fueron analizados aplicando el modelo lineal mixto y el nivel de significación fue establecido en  $p < 0,05$ . AOO: aceite de orujo de oliva; AGAO: aceite de girasol alto oleico; AG: aceite de girasol; (N): grupo normocolesterolémico; (H): grupo hipercolesterolémico; GIP: polipéptido inhibidor gástrico; GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1.

\* Diferencias entre el grupo normocolesterolémico e hipercolesterolémico en los valores de insulina ( $p=0,002$ ).

Las incretinas GIP y GLP-1 son hormonas sintetizadas en el tracto gastrointestinal en respuesta a la ingesta de nutrientes, que aumentan la secreción y liberación de la insulina y disminuyen la secreción de glucagón en función de la glucosa circulante (Sánchez-Rodríguez y cols., 2021). En la presente Tesis Doctoral, donde no se observaron diferencias significativas en ningún caso en los niveles de GIP y GLP-1 (Figura 21), se reportan valores de ambas incretinas tras un periodo de ayuno de 8 a 10 horas. Por este motivo, los datos mostrados en la Figura 21 de GIP y GLP-1 no permiten valorar el posible efecto postprandial tras la ingesta de AOO, AGAO y AG.

Por otra parte, con la finalidad de conocer el comportamiento de la intervención dietética sobre algunas adipoquinas y moléculas secretadas principalmente por el tejido adiposo, se analizaron las concentraciones de resistina, PAI-1, visfatina, adiposina y adiponectina (Figuras 21 y 22). Estos marcadores no mostraron variaciones significativas por efecto de la intervención dietética con el AOO, AGAO y AG, salvo la visfatina ( $p=0,003$ ; Figura 22). De acuerdo a la Figura 22, esta macromolécula liberada por el tejido adiposo aumentó tras la ingesta de AOO y AG, disminuyendo tras la ingesta de AGAO en ambos grupos de población. La dirección ascendente tras la ingesta de AOO no guardaría relación con lo observado en un estudio realizado por Kim y cols. (2014), que mostró cómo durante la diferenciación adipogénica de los adipocitos 3T3-L1 disminuía la expresión de visfatina de forma dosis-dependiente tras la suplementación del medio de cultivo con ácido oleanólico. No obstante, dichos experimentos *in vitro* se realizaron con dosis de este ácido triterpénico elevadas (1-25  $\mu\text{M}$ ), por lo que estos resultados han de tomarse con cautela. En cualquier caso, sería interesante comprobar si lo observado en el presente estudio comparativo se reproduce en otros ensayos, en especial en sujetos con sobrepeso u obesidad.

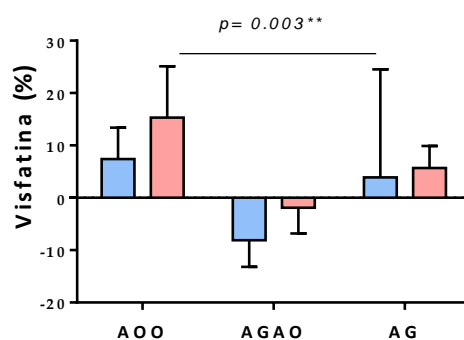


Figura 22. Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en la concentración de visfatina en sangre.

Los valores representan la tasa de cambio calculada a partir de  $[(\text{valor post-tratamiento} - \text{pretratamiento}) / \text{valor pretratamiento}]$  y las barras de error representan el error estándar de la media, SEM (ambos expresados como porcentaje). Aceite de orujo de oliva (AOO), aceite de girasol alto oleico (AGAO), aceite de girasol (AG). Según el modelo lineal mixto, el efecto del aceite fue estadísticamente significativo ( $p=0,003$ ).

La hormona anorexigénica leptina y la hormona orexigénica grelina son cruciales para la regulación del apetito, la ingesta de alimentos y el metabolismo energético. La resistencia a la leptina y la grelina promueve la adiposidad y puede contribuir a las enfermedades relacionadas con esta afección más allá de los trastornos metabólicos (Cui y cols., 2017). Según muestra la Figura 23, las concentraciones séricas de grelina ( $p=0,011$ ) y leptina ( $p=0,005$ ) mostraron cambios significativos por efecto del aceite. De este modo, la hormona grelina aumentó en ambos grupos de voluntarios, normo e hipercolesterolémicos, tras la intervención dietética con el AOO y AG, y disminuyó tras la ingesta de AGAO. En cuanto a la leptina, salvo una disminución del  $-0,1\%$  en el grupo normocolesterolémico tras la ingesta de AOO, experimentó una evolución al alza tras la ingesta de AOO (en el grupo de riesgo), AGAO y AG en ambos grupos de población (Figura 23). Los estudios realizados en ratones obesos tras la administración de ácido oleanólico (10 mg/kg) y ácido ursólico (50 mg/L, en el agua de bebida) observaron una disminución de los niveles de grelina (de Melo y cols., 2010; Rao y cols., 2011), contrario a lo observado en el presente ensayo tras la intervención con el AOO. En relación con la leptina, los resultados reportados en la literatura son contradictorios. De Melo y cols. (2010) y Rao y cols. (2011) observaron un aumento de los niveles plasmáticos de esta hormona en ratones tratados con los ácidos oleanólico (10 mg/kg) y ursólico (0,05%, 50

mg/L) en agua. Por el contrario, un estudio desarrollado por Jia y cols. (2015) mostró una disminución de los niveles de leptina tras la administración oral de ácido ursólico (50 y 200 mg/kg), en consonancia con lo observado en voluntarios sanos tras la administración de AOO. Sin embargo, la cantidad de compuestos triterpénicos aportados por el AOO en nuestros estudios (equivalente a 8,4 mg/día de ácido oleanólico y trazas de ácido ursólico) es significativamente inferior a las administradas en los estudios citados, lo que justificaría los controvertidos resultados obtenidos.

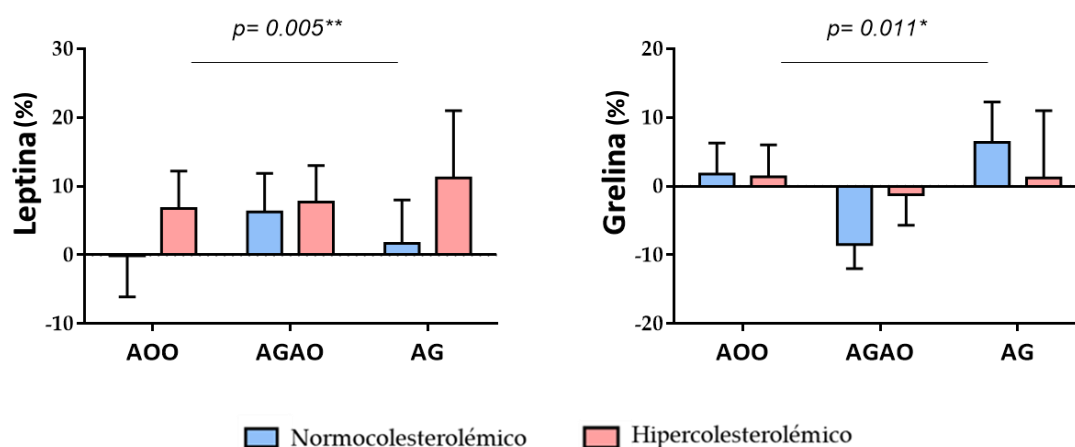


Figura 23. Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en la concentración de leptina y grelina en sangre.

Los valores representan la tasa de cambio calculada a partir de  $[(\text{valor post-tratamiento} - \text{pretratamiento}) / \text{valor pretratamiento}]$  y las barras de error representan el error estándar de la media, SEM (ambos expresados como porcentaje). Aceite de orujo de oliva (AOO), aceite de girasol alto oleico (AGAO), aceite de girasol (AG). Según el modelo lineal mixto, el efecto del aceite fue estadísticamente significativo: Leptina;  $p = 0,005$  y grelina;  $p = 0,011$ .

### 3.3.2. Efecto del consumo prolongado de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en marcadores inflamatorios.

Dado que la inflamación desempeña un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad, la diabetes y la hipertensión (Valero-Muñoz y cols., 2014), en la presente Tesis Doctoral se determinaron los niveles circulantes de una amplia gama de citoquinas con el fin de evaluar el efecto del AOO, AGAO y AG sobre el estado inflamatorio. Se sabe que las citoquinas son un grupo de proteínas y glicoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan

fundamentalmente como reguladores de la inflamación, donde se mantiene un balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Según se puede observar en las Figuras 24 y 25, no se detectaron cambios estadísticamente significativos tras el consumo regular de AOO, AGAO y AG en ninguno de los parámetros analizados. Cabe señalar que, a pesar de las elevadas concentraciones de colesterol en el grupo de riesgo, esta población no presentaría un estado inflamatorio establecido. Por lo tanto, no fue sorprendente no encontrar cambios importantes en los parámetros inflamatorios evaluados.

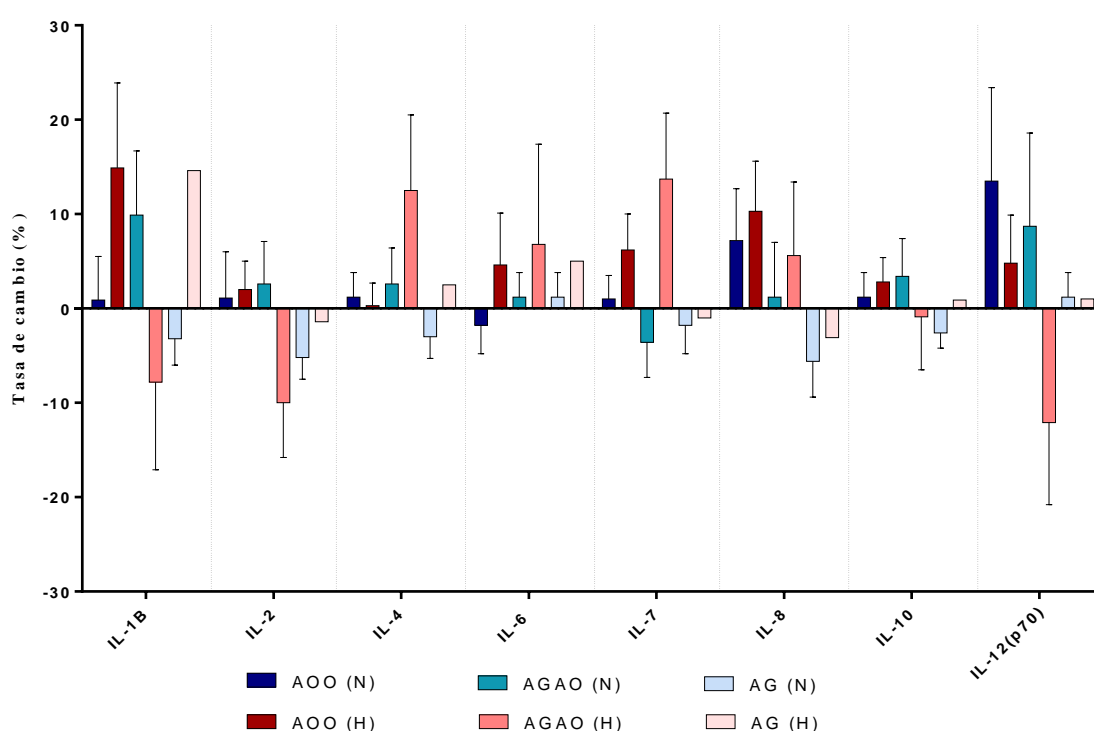


Figura 24. Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en marcadores inflamatorios.

Los valores representan la tasa de cambio calculada a partir de  $[(\text{valor post-tratamiento}) - (\text{valor pretratamiento}) / \text{valor pretratamiento}]$  y las barras de error representan el error estándar de la media, SEM (ambos expresados como porcentaje). Los datos fueron analizados aplicando el modelo lineal mixto y el nivel de significación fue establecido en  $p < 0,05$ . AOO: aceite de orujo de oliva; AGAO: aceite de girasol alto oleico; AG: aceite de girasol; (N): grupo normocolesterolémico; (H): grupo hipercolesterolémico; IL: interleuquina.

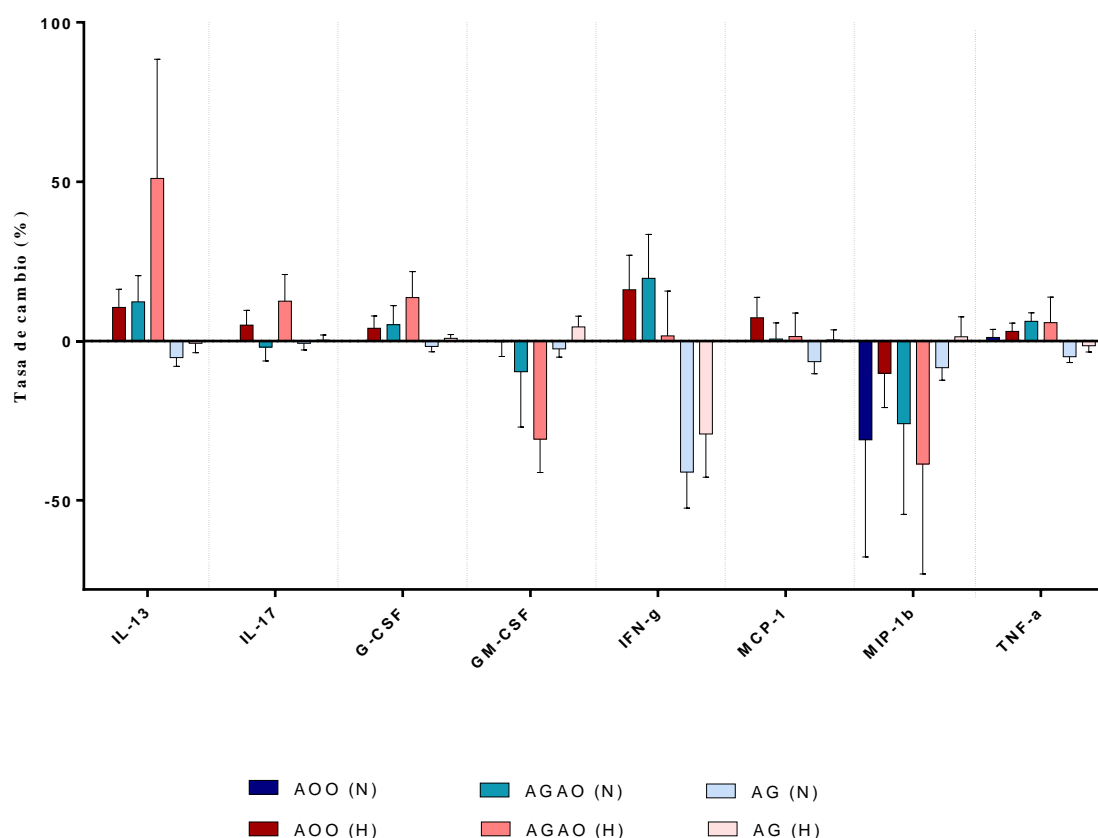


Figura 25. Efecto del consumo de aceite de orujo de oliva, aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol en marcadores inflamatorios.

Los valores representan la tasa de cambio calculada a partir de [(valor post-tratamiento) - (valor pretratamiento)/valor pretratamiento] y las barras de error representan el error estándar de la media (ambos expresados como porcentaje). Los datos fueron analizados aplicando el modelo lineal mixto y el nivel de significación fue establecido en  $p < 0,05$ . AOO: aceite de orujo de oliva; AGAO: aceite de girasol alto oleico; AG: aceite de girasol; (N): grupo normocolesterolémico; (H): grupo hipercolesterolémico; IL: interleuquina. IL: interleuquina; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; IFN- $\gamma$ : interferón gamma; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; MIP-1 $\beta$ : proteína inflamatoria de magrófagos-1 beta; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

La relación entre el consumo de AOO enriquecido con ácidos triterpénicos (ácidos maslínico y oleanólico) y la producción de mediadores inflamatorios ha sido evaluada en distintos ensayos desarrollados en modelos murinos (Valero-Muñoz y cols., 2014; Claro-Cala y cols., 2020). En dichos estudios se encontró una menor expresión de TNF- $\alpha$  y MCP-1 cuando los animales fueron alimentados con AOO enriquecido con ácido

maslínico y ácido oleanólico. Sin embargo, los ensayos fueron realizados en modelos animales con patologías como la hipertensión (Valero-Muñoz y cols., 2014) u obesidad (Claro-Cala y cols., 2020), que implican procesos inflamatorios. Por lo tanto, serían necesarios estudios de intervención nutricional con AOO en sujetos con patologías que cursen con procesos inflamatorios para determinar el posible efecto antiinflamatorio de este aceite vegetal.

En lo que respecta al AG, en un reciente ensayo clínico realizado en 60 voluntarios diagnosticados con síndrome metabólico se observó una reducción significativa de la IL-6 tras la ingesta de 25 mL/día de AG durante siete semanas (Akrami y cols., 2020). Este resultado no guardaría relación con la aparente tendencia al alza de la IL-6 en ambos grupos de población tras la ingesta de AG en nuestro estudio (Figura 24). No obstante, es importante señalar que ni los participantes seleccionados ni la cantidad diaria administrada de AG en el estudio de Akrami y cols. son comparables con los de los estudios recogidos en esta Tesis Doctoral. Por tanto, como se señalaba anteriormente, sería conveniente realizar futuras investigaciones en pacientes que padezcan patologías que cursen con estados inflamatorios para comprobar los observado en estudios previos.



# **DISCUSIÓN INTEGRADORA**



El AOO es una grasa preferentemente monoinsaturada con un importante y variado contenido en componentes minoritarios que han demostrado ejercer propiedades beneficiosas tanto en salud cardiovascular como en patologías asociadas (hipertensión, obesidad, diabetes e inflamación). Dichas propiedades han sido reportadas en diversos estudios *in vitro* y preclínicos llevados a cabo con uno o varios componentes menores puros administrados como suplementos dietéticos (Lee y cols., 2013; Fukumitsu y cols., 2016) o bien tras el consumo de aceites enriquecidos con alguno de dichos componentes, principalmente con ácidos triterpénicos (Valero-Muñoz y cols., 2014; Sánchez-Rodríguez y Mesa, 2018; Claro-Cala y cols., 2020). Asimismo, otros estudios también se han llevado a cabo para conocer el efecto postprandial en la composición de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) tras el consumo puntual de altas dosis de AOO (Cabello-Moruno y cols., 2007; Cabello-Moruno y cols., 2015). Sin embargo, la inexistencia de estudios clínicos con este aceite vegetal no permite comprobar si lo observado en estos ensayos se reproduce en humanos.

Esta falta de conocimiento científico sobre el efecto en salud del consumo a dosis nutricionales de AOO motivó la realización de la presente Tesis Doctoral. Para ello se llevaron a cabo dos ensayos clínicos aleatorizados, cruzados, ciegos y controlados con una duración de 14 semanas cada uno de ellos. Uno de los principales objetivos de estos estudios era comprobar el potencial efecto cardioprotector del AOO, partiendo de la hipótesis de que, dada su riqueza en ácido oleico, el AOO ejercería un efecto beneficioso en salud cardiovascular, al igual que el reconocido efecto del AOVE, pero también en razón a su contenido en componentes minoritarios con potenciales efectos cardioprotectores. Por ello se seleccionó como grupo de estudio sujetos con riesgo cardiovascular, personas moderadamente hipercolesterolémicas que no precisaran tratamiento farmacológico y para quienes una estrategia nutricional fácilmente asumible, como es la incorporación de AOO en su dieta, podría mejorar su estado de salud. Asimismo, era de indudable interés conocer los efectos que el AOO podría ejercer sobre el consumidor tipo, por lo que se incluyó otro grupo de población constituido por personas sanas, sin riesgo cardiovascular ni, a priori, riesgo de otras patologías cardiometabólicas.

Durante el desarrollo del primer estudio, el AOO fue comparado con el AGAO, seleccionado como aceite control por su semejanza en el contenido de ácidos grasos monoinsaturados. Así, las diferencias en la fracción minoritaria de ambos aceites

permitirían valorar el efecto de los componentes menores del AOO sobre los distintos parámetros evaluados. Los satisfactorios resultados obtenidos en este primer estudio llevaron a realizar un segundo ensayo de intervención donde el AOO fue comparado con el AG, dado el elevado consumo en España de esta fuente grasa poliinsaturada, pues es el segundo tipo de aceite más consumido en nuestro país después del aceite de oliva, superando su consumo al de AOV y al AOVE (MAPA, 2021). Además, el desarrollo de esta segunda intervención permitiría conocer con mayor profundidad el comportamiento de los componentes bioactivos del AOO sobre los distintos biomarcadores estudiados. Como paso previo al análisis estadístico de los diferentes marcadores analizados, se monitorizó la ingesta dietética de los voluntarios para comprobar que los hábitos dietéticos no habían variado en ambas intervenciones. Así, los cambios observados en los diferentes parámetros evaluados serían atribuibles a la intervención dietética con el AOO, AGAO y AG.

A continuación, se discutirán de manera integradora los resultados más relevantes obtenidos al comparar ambas intervenciones nutricionales, con la finalidad de responder a los objetivos específicos planteados en la presente Tesis Doctoral.

Como se ha descrito en la introducción, el perfil de AGM y los componentes bioactivos presentes de forma natural en el AOO han demostrado jugar un papel clave en la prevención de las ECV y la modulación de sus factores de riesgo, según lo observado en numerosos estudios en animales e *in vitro*, modulando el perfil lipídico, mejorando la función endotelial, induciendo efectos hipotensores o disminuyendo biomarcadores inflamatorios (revisión de Mateos y cols., 2020). Por ello, uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral fue evaluar el efecto cardioprotector del consumo a dosis nutricionales de AOO. A este respecto, y debido a la ausencia de ensayos clínicos previos desarrollados con este aceite, se decidió analizar un gran número de parámetros y biomarcadores implicados en los trastornos cardiovasculares. Esto permitiría conocer en profundidad el comportamiento de esta fuente grasa frente a la aparición y el desarrollo de esta patología, considerada como la principal causa de mortalidad en España.

Los resultados obtenidos al comparar ambas intervenciones nutricionales revelaron un efecto hipolipidémico tras el consumo de AOO tanto en sujetos sanos como en sujetos con niveles elevados de colesterol, dada la evolución significativamente descendente en los niveles séricos de CT y LDL-C (Figura 2 del artículo III). Este comportamiento no se

observó tras la ingesta regular de AGAO (con una proporción de AGM similar al AOO) y AG, ya que mostraron una evolución ascendente en ambos grupos de población, con la excepción del CT en el grupo de riesgo tras la ingesta de AG, que se mantuvo estable. Sin embargo, los resultados obtenidos en cada ensayo de intervención fueron distintos, pues en el primer estudio el LDL-C disminuyó significativamente tras el consumo de AOO en ambos grupos de población, mientras que se produjo un efecto contrario tras la ingesta de AGAO (Tabla 3 del artículo I), observándose la misma tendencia en el caso del CT aunque sin alcanzar significación estadística. Por el contrario, en el segundo estudio no se detectaron cambios significativos en el perfil lipídico tras la ingesta de AOO y AG.

De nuevo, estas discrepancias se observaron también en otros predictores de riesgo cardiovascular, como fueron las concentraciones séricas de Apo B, Apo A1 y la relación de ambas (Apo B/Apo A1). Se sabe que las apolipoproteínas son componentes esenciales de las partículas lipoproteicas que contribuyen a predecir el riesgo de ECV, ya que modulan la actividad de determinadas enzimas que actúan sobre las lipoproteínas, mantienen la integridad de la estructura del complejo lipoproteico y son ligandos de determinados receptores de la superficie celular que facilitan la captación de las lipoproteínas (Hamedi-Kalajahi y cols., 2021). Por lo tanto, Apo B, Apo A1 y la relación Apo B/Apo A1 son considerados importantes predictores de ECV junto con los biomarcadores del perfil lipídico. Por un lado, los niveles elevados de Apo B en suero se asocian a un mayor riesgo cardiovascular, ya que la Apo B es la principal apolipoproteína implicada en el inicio y la progresión de la aterosclerosis (Sato y cols., 2016). Por otra parte, la Apo A1 es el principal componente de la partícula HDL-C y actúa como un elemento clave en la transferencia de fosfolípidos y colesterol libre de los tejidos periféricos al hígado (Sato y cols., 2016; Hamedi-Kalajahi y cols., 2021). En consecuencia, los niveles elevados de Apo A1 se asocian a un índice de riesgo cardiovascular bajo, mientras que un aumento de la relación Apo B/Apo A1 se relaciona con eventos cardiovasculares (Sato y cols., 2016).

Los resultados de nuestra investigación fueron contradictorios en cada intervención, de modo que Apo B disminuyó significativamente en los sujetos sanos y, en especial, en los hipercolesterolémicos tras el consumo de AOO en el primer estudio (Tabla 3 del artículo I), mientras que se incrementaron tras el consumo de AOO y AG en ambos grupos de población en el segundo estudio (Tabla 4 del artículo II). El análisis conjunto de los

resultados de ambos estudios mostró un aumento de los niveles de Apo B tras la ingesta de AOO y AG, siendo más marcado tras la intervención dietética con el AG (Figura 2 del artículo III). En cambio, tras el consumo de AGAO, los valores de esta apolipoproteína (Apo B) apenas cambiaron en el grupo normocolesterolémico y descendieron ligeramente en el grupo hipercolesterolémico. En el primer estudio, el descenso de Apo B tras la ingesta de AOO era coherente con la disminución en los niveles séricos de CT y LDL-C observada en ambos grupos de población, no así lo obtenido tras el análisis conjunto de los resultados de ambos estudios.

En este punto, es importante preguntarse a qué puede deberse la distinta respuesta del AOO en el perfil lipídico y lipoproteico en ambos estudios de intervención. Como se ha mencionado, numerosos estudios relacionan el consumo de grasas monoinsaturadas (en especial ricas en ácido oleico, como el AOV/AOVE) con efectos beneficiosos sobre los lípidos sanguíneos. Por tanto, a priori cabría esperar que dos aceites monoinsaturados como el AOO y el AGAO podrían ejercer un efecto positivo en el perfil lipídico más notable que el AG. El claro efecto beneficioso del AOO respecto al AGAO en el primer estudio, ambos con similar contenido en ácido oleico, sugería que eran los componentes minoritarios del AOO los responsables de estos resultados, ejerciendo un notable efecto modulando los niveles de CT, LDL-C, Apo B, etc. Siguiendo esta línea de pensamiento, en el segundo estudio era de esperar mayores diferencias entre los dos aceites empleados, tanto por la positiva aportación de los componentes minoritarios del AOO apuntada en el primer estudio, como por la menor presencia de ácidos grasos monoinsaturados en el AG. Por el contrario, en este segundo estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el perfil lipídico ni en las lipoproteínas analizadas tras el consumo de AOO o AG.

Entre las posibles causas a analizar como responsables de las diferencias en los resultados de ambos estudios cabe pensar en la composición del AOO. Es cierto que el aceite empleado en el primer estudio era más rico en algunos de los componentes bioactivos como escualeno,  $\alpha$ -tocoferol o alcoholes triterpénicos que el AOO empleado en el segundo estudio, aunque el contenido en alcoholes grasos alifáticos fue muy superior en el AOO de la segunda intervención y ambos aceites de orujo tuvieron una composición similar en ácidos triterpénicos (Tablas Suplementarias 1 de los artículos I y II, respectivamente). Carecemos de antecedentes suficientes para poder atribuir las

discrepancias observadas en ambas intervenciones a estas pequeñas diferencias en la composición de la fracción minoritaria, por lo que sería necesario realizar más estudios al respecto.

Por otra parte, es importante recordar que el aceite empleado en las etapas basal y de lavado fue distinto en ambos estudios. Mientras que en el segundo estudio los voluntarios tomaron aceite de maíz, en el primero fue precisamente el aceite control usado en el segundo estudio, el AG, el que consumieron los voluntarios durante el lavado en la primera intervención. Esto podría interpretarse como un importante fallo en el diseño experimental. No obstante, ha de entenderse que el primer estudio comparando AOO y AGAO era, a priori, el único estudio previsto realizar para valorar los posibles efectos en salud del consumo del AOO en la dieta. Por tanto, el diseño experimental era robusto, estando claramente justificado el uso del AGAO como aceite control para valorar la aportación de la distintiva y propia fracción minoritaria del AOO en salud al igualar el efecto de la grasa monoinsaturada en ambos aceites, AOO y AGAO. El uso del AG en las etapas de lavado era igualmente lógico basándonos en el alto consumo de este aceite y en la similar tipología con los dos aceites anteriores al tratarse los tres de aceites refinados. Sin embargo, no se puede descartar que el distinto aceite de lavado tomado en cada estudio, girasol y maíz, haya podido afectar a los resultados obtenidos en cada intervención.

Por último, otro factor que claramente ha podido influir en los resultados obtenidos es el hecho de que los dos estudios implicaron voluntarios diferentes y se realizaron en distintas épocas del año (primavera-verano en el estudio 1, realizado en los meses de abril-julio de 2018; otoño-invierno en el estudio 2, realizado entre los meses de octubre-diciembre de 2019). Son cada vez más abundantes las evidencias científicas que avalan la importancia de la variabilidad interindividual en la respuesta a las intervenciones nutricionales, en especial con compuestos bioactivos (Manach y cols., 2017; Milenkovich y cols., 2017; González-Muniesa y Martínez, 2019; Morand y cols., 2020). Factores genéticos, epigenéticos, metabólicos, la composición de la microbiota intestinal, el cronotipo o los hábitos dietéticos y de estilo de vida van a influir en la respuesta de cada individuo ante la ingesta de un alimento o nutriente, por lo que en nutrición, al igual que en medicina, cada vez cobra más importancia la Nutrición de Precisión en la valoración y el manejo de enfermedades crónicas no transmisibles (Ramos-López y cols., 2017;

González-Muniesa y Martínez, 2019; Zeisel, 2020). Por tanto, no se puede descartar que la variabilidad interindividual en la respuesta de los voluntarios participantes en los dos estudios de intervención haya podido contribuir en parte a las diferencias observadas en los resultados obtenidos. Pero además, la distinta época del año en que se realizaron ambas intervenciones también podría haber influido en dichas diferencias, puesto que además de los ritmos circadianos, los ritmos estacionales o circanuales pueden influir no sólo en los efectos derivados del consumo de compuestos con propiedades bioactivas, sino también en diversos procesos metabólicos, como avalan numerosos estudios sobre Crononutrición (Oike y cols., 2014; Kanikowska y cols., 2015; Arola-Arnal y cols., 2019; Montaruli y cols., 2021). En concreto, se ha descrito que los niveles circulantes de lípidos (colesterol, TG), glucosa o insulina son más elevados en invierno que en verano, ocurriendo también una mayor acumulación de grasa corporal y aumentando el riesgo de enfermedades cardiometabólicas en invierno (Pell y Cobbe, 1999; Wen, 2007; Asher y cols., 2015; Kanikowska y cols., 2015). Por tanto, tampoco se puede descartar un posible efecto diferencial de la estacionalidad en los distintos resultados obtenidos en ambos estudios.

Todos estos aspectos ponen de manifiesto la dificultad intrínseca de la realización de estudios en humanos y los numerosos factores que pueden afectar a la heterogeneidad en la respuesta a cada intervención, factores imposibles de controlar o estandarizar en su totalidad. Por ello, es importante que los estudios se realicen en un número suficientemente alto de voluntarios de modo que, al menos parcialmente, se pueda acotar el efecto de la variabilidad interindividual. En nuestro caso, los dos estudios de intervención tuvieron suficiente poder estadístico para poder observar diferencias estadísticamente significativas y extraer así conclusiones de los mismos. Sin embargo, el combinar los resultados de ambos estudios puede ser ventajoso al aumentar el tamaño muestral total y amortiguar la posible influencia estacional en los resultados. Por ello, en adelante la discusión se centrará más en los resultados derivados del análisis del conjunto de la población.

Retomando los efectos observados sobre el perfil lipídico, considerando la ausencia o el bajo contenido en el AGAO y el AG de los compuestos minoritarios propios del AOO, y que el comportamiento en estos marcadores del perfil lipídico fue opuesto, como se ha comentado, el efecto hipolipidémico tras el consumo prolongado de AOO fue

atribuido a su específica composición en compuestos bioactivos. Entre todos ellos, la fracción triterpénica del AOO, en particular el ácido oleanólico y el ácido maslínico, no sólo ha sido la más explorada, sino que también estos ácidos han demostrado en distintos ensayos *in vivo* modular positivamente los niveles de lípidos en sangre tras la administración oral de diferentes dosis de los mismos (15 mg/kg, Hussain Shaik y cols., 2012; 100 mg/kg, Liu y cols., 2007), así como tras la administración de AOO enriquecido en dichos compuestos (Claro-Cala y cols., 2020). Del mismo modo, un estudio realizado en pacientes hiperlipidémicos que consumieron comprimidos de ácido oleanólico (cuya cantidad no fue reportada por los autores), también observó menores concentraciones de CT, TG y LDL-C. Ahora bien, cabe señalar que en estos estudios la dosis administrada de estos compuestos fue notablemente superior a la aportada por los 45 g/día de AOO en nuestros estudios (~ 8,4 mg/día de ácido oleanólico; ~ 0,10 mg/día de ácido maslínico). Los alcoholes grasos alifáticos del AOO también podrían haber contribuido a estos efectos en el perfil lipídico. Hargrove y cols. (2004), tras revisar diferentes estudios clínicos, pusieron de manifiesto cómo el consumo de 5 a 20 mg al día de una mezcla de alcoholes mixtos de entre 24 a 34 átomos de carbono ayudaba a bajar los niveles de LDL-C y aumentar los de HDL-C. El AOO utilizado en el primer estudio estaría proporcionando una cantidad de 44 mg/día de este tipo de compuestos, lo que podría justificar el efecto observado disminuyendo el LDL-C. Por tanto, esta situación hace pensar que tanto la fracción triterpénica como los alcoholes grasos alifáticos, o incluso otros componentes menores del AOO, han podido contribuir positivamente en el descenso de los niveles de CT y LDL-C, sosteniendo nuestra hipótesis de que los componentes bioactivos de este aceite vegetal pueden ejercer un efecto hipolipidémico, tanto en consumidores sanos como en aquellos con riesgo de desarrollar una patología cardiovascular.

Del mismo modo, el comportamiento de la Apo B en el análisis conjunto de nuestra población de voluntarios difirió de lo observado en un estudio postprandial realizado tras el consumo de altas dosis de AOO (70 g) (Cabello-Moruno y cols., 2007). En lo que respecta a la Apo A1, encontramos una tendencia positiva al alza tras la ingesta de AOO, AGAO y AG, sin diferencias estadísticas entre los aceites estudiados. En cambio, la relación Apo B/Apo A1 mostró cambios significativos, destacando el aumento tras el consumo de AG frente a la disminución con el AGAO y AOO en el grupo hipercolesterolémico. Por tanto, la tendencia al alza de la Apo A1 en ambos grupos, así

como la disminución de la relación Apo B/Apo A1 en el grupo de riesgo tras la ingesta de AOO, estuvo en consonancia con la disminución en los marcadores de CT y LDL-C, y no guardaría relación con lo observado en las concentraciones séricas de Apo B. Para establecer el comportamiento del AOO sobre estos biomarcadores, sería conveniente el desarrollo de futuras investigaciones con un diseño similar al aplicado en nuestros ensayos con el objetivo de aclarar los controvertidos resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

Además del perfil lipídico, se evaluaron otros factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la arterosclerosis, considerada la principal causa de ECV (Lahoz y Mostaza, 2007). Por consiguiente, también se determinó la presión arterial y diferentes biomarcadores de disfunción endotelial e inflamación implicados en la formación de la placa de ateroma, con el fin de comprobar el potencial efecto cardioprotector del consumo prolongado de AOO. Diversos estudios previos desarrollados en modelos murinos hipertensos ya informaron cómo el tratamiento con AOO enriquecido con ácidos triterpénicos (ácido oleanólico y ácido maslínico) podía mejorar la función arterial, aumentando la expresión de eNOS y EDHF (Rodríguez-Rodríguez y cols., 2009; Valero-Muñoz y cols., 2014), reduciendo la presión arterial (Valero-Muñoz y cols., 2014) y disminuyendo la expresión de mediadores inflamatorios estrechamente relacionados con la disfunción endotelial (TNF- $\alpha$ ) (Valero-Muñoz y cols., 2014). De manera similar, el consumo de AOO fortificado con ácido oleanólico y ácido maslínico también demostró mejorar la función vascular en ratas con obesidad inducida por la dieta (Claro-Cala y cols., 2020). En nuestro caso, tal y como se comenta en los resultados del artículo III, el consumo prolongado de AOO no mostró cambios estadísticamente significativos en ninguno de los parámetros de presión arterial, función endotelial y marcadores inflamatorios analizados. Estos resultados estuvieron dentro de lo esperado teniendo en cuenta que, a pesar de las elevadas concentraciones de colesterol en el grupo de riesgo, contábamos con una población que no había sido diagnosticada de ninguna patología ligada a niveles alterados de estos biomarcadores. Además, es importante señalar que en ambos estudios se proporcionó AOO sin enriquecer con compuestos bioactivos, con una ingesta diaria recomendada (de 45 g/día) que trató de reproducir patrones de consumo habituales, pero que proporcionó cantidades reducidas de estos componentes minoritarios. Todo esto explica que muchos de los resultados observados en los estudios desarrollados en animales hipertensos u obesos tras la administración de altas dosis de

AOO suplementado o enriquecido con altas concentraciones de compuestos bioactivos sean difíciles de extrapolar a nuestra investigación. No obstante, es importante remarcar que nuestros resultados evidenciaron una mayor expresión de eNOS no estadísticamente significativa en ambos grupos de población tras el consumo de AOO y AGAO. Considerando que el óxido nítrico (NO) es un factor clave en la regulación vascular debido a su acción vasodilatadora (Carvajal-Carvajal, 2017), esta situación puso de manifiesto que el alto contenido en ácido oleico en el AOO y AGAO mejoró ligeramente la función endotelial a través de la activación de eNOS, en línea con otros ensayos clínicos llevados a cabo con la dieta mediterránea, rica en AGM (Esposito y cols., 2004; Yubero-Serrano y cols., 2020). Además, en consonancia con lo informado por los estudios previos desarrollados en animales, es posible que la ingesta de ácidos triterpénicos proporcionados por el AOO, aunque fuera relativamente baja, haya podido contribuir positivamente a este efecto beneficioso.

Una vez completada la evaluación de todos estos parámetros, que permitieron determinar el efecto protector de esta fuente grasa en la ECV, el siguiente objetivo planteado fue conocer el efecto del consumo de AOO en aquellas patologías relacionadas con la enfermedad coronaria, como son la DM2 y la obesidad. En lo que respecta a la diabetes, para evaluar el efecto de la intervención dietética con el AOO y los aceites control (AGAO y AG) sobre parámetros asociados con la resistencia a la insulina y la DM2, se determinaron los valores de glucosa, insulina y HbA1c, tres parámetros bioquímicos empleados comúnmente en la práctica clínica para la detección de esta patología. Cabe destacar que, según los valores medios iniciales (pretratamiento) y finales (postratamiento) mostrados en el artículo III (sección 3.3), todas las analíticas se encontraron dentro de los valores normales para la población adulta sana, que son 70-100 mg/dL en el caso de la glucosa en ayunas y <5,5% para la HbA1c (FEDE, s.f). Este hecho evidenció que los participantes del estudio no eran diabéticos en ninguno de los dos grupos (normocolesterolémicos e hipercolesterolémicos). Los resultados al comparar ambas intervenciones reflejaron una dirección descendente en la concentración de insulina tras la ingesta de AOO y AG, así como ascendente tras la ingesta de AGAO en el grupo de sujetos sanos. Para el grupo hipercolesterolémico, la insulina mostró una tendencia ascendente tras la intervención con los tres tipos de aceite, lo que provocó diferencias no sólo por el consumo de aceite sino también por el grupo. Este último resultado fue previsible dado que la hipercolesterolemia no es un factor de riesgo

independiente, sino que está ligada a otras patologías como la DM; por tanto, es normal que los niveles de colesterol moderadamente elevados estuvieran acompañados de niveles de insulina ligeramente superiores, sin alcanzar valores de riesgo (Xi y cols., 2020b). Además, en el grupo de sujetos sanos se observó una mejora en los índices que informan de la resistencia (HOMA-IR) y la sensibilidad a la insulina (QUICKI) tras la ingesta de AOO y AG. Todos estos resultados tras el consumo prolongado de AOO en el grupo de sujetos sanos reforzaron lo observado en diversos ensayos *in vivo* tras la administración oral de ácidos triterpénicos (ácido ursólico o ácido oleanólico), así como tras el consumo de AOO enriquecido en estos compuestos (ácidos oleanólico y maslínico), presentes de manera natural en el AOO (de Melo y cols., 2010; Wang y cols., 2013; Claro-Cala y cols., 2020; González-Garibay y cols., 2020). Del mismo modo, otro ensayo desarrollado en sujetos prediabéticos también relacionó el consumo, esta vez de aceite de oliva enriquecido con ácido oleanólico, con un menor riesgo de desarrollar diabetes, promoviendo el uso de este ácido triterpénico (ácido oleanólico) como nuevo ingrediente funcional para la prevención de la DM2 (Santos-Lozano y cols., 2019). Sin embargo, la cantidad de ácidos triterpénicos administrada y los modelos empleados (obesos o diabéticos), tanto en los estudios en animales como en la intervención nutricional, no guardan semejanza con el diseño de nuestros ensayos. Por tanto, sería interesante realizar futuras investigaciones con el AOO enriquecido en compuestos triterpénicos, tanto en población sana como diabética, para ver si, además de lo observado en esta Tesis Doctoral, se modifican otros biomarcadores como la glucosa o la Hb1Ac.

Además de los parámetros citados anteriormente y con la finalidad de conocer el comportamiento de la intervención dietética sobre la patogenia de la obesidad, se realizaron distintas mediciones antropométricas y de composición corporal a lo largo de ambos ensayos clínicos. A este respecto, uno de los resultados más relevantes fue que la ingesta prolongada de AOO y AG redujo ligeramente el perímetro de cintura en ambos grupos de población. Esta medición se emplea para estimar la grasa abdominal y valorar el riesgo de sufrir un evento cardíaco (Ashwell y cols., 2012). Por tanto, el descenso del perímetro de cintura reforzó los potenciales beneficios asociados al efecto hipolipidémico observado tras la intervención dietética con el AOO en ambos grupos de población en el manejo dietético de sujetos con riesgo cardiovascular. Dado que el comportamiento del perímetro de la cintura tras la ingesta de AGAO fue opuesto, y que esta fuente de grasa tiene un perfil de AGM similar al AOO, el efecto favorable sobre este marcador se

relacionó con la específica composición en compuestos bioactivos del AOO. En este sentido, un reciente estudio desarrollado en ratones obesos evidenció una pérdida de peso en aquellos animales alimentados con AOO enriquecido con ácidos triterpénicos (ácidos oleanólico y maslínico) (Claro-Cala y cols., 2020). Esta asociación también está respaldada por los efectos positivos del ácido oleanólico sobre la adiposidad visceral (de Melo y col., 2010) y el peso corporal (Djeziri y cols., 2018) en modelos murinos obesos, efecto que estaría mediado por múltiples vías de acción que incluirían la regulación de cascadas de señalización de la insulina en tejido adiposo, la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias y la señalización del inflammasoma en este tejido mediada por la actividad antioxidante del ácido oleanólico, así como la regulación de la función mitocondrial y el metabolismo y función secretora en el adipocito, entre otros mecanismos, tal como se recoge en una reciente revisión de Claro-Cala y cols. (2022).

En nuestro caso, la reducción del perímetro de cintura estuvo acompañada de una tendencia a la disminución de la grasa visceral y el peso corporal (sin alcanzar el nivel de significación) en el grupo normocolesterolémico y, en menor medida, en el grupo de riesgo tras la ingesta de AOO. No obstante, es probable que el uso de un aceite natural en lugar de un aceite suplementado y el hecho de que nuestros participantes no padeciesen obesidad (en ninguno de los dos grupos), no hayan permitido observar más cambios significativos en los parámetros antropométricos evaluados.

Otros hallazgos a destacar tras el análisis de varias adipoquinas y moléculas secretadas principalmente por el tejido adiposo u otros órganos como el estómago, fueron la hormona anorexigénica leptina y la hormona orexigénica grelina. Dichos polipéptidos desempeñan un importante papel en la regulación del apetito y del metabolismo energético, de forma que una producción o secreción alterada de estas hormonas contribuye al desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina o la ECV (Recinella y cols., 2020). De acuerdo a los resultados recogidos en el artículo III (sección 3.3), la hormona grelina aumentó en ambos grupos tras la intervención dietética con el AOO y AG, y disminuyó tras la ingesta prolongada de AGAO. El resultado obtenido tras la ingesta de AOO no coincidió con lo reportado por otros autores (de Melo y cols., 2010; Rao y cols., 2011) que evidenciaron una disminución de los niveles de grelina tras la administración de ácido oleanólico (10 mg/kg) y ácido ursólico (50 mg/L, en el agua de bebida) en ratones obesos. En cuanto a la leptina, salvo

una mínima disminución en el grupo normocolesterolémico tras la ingesta de AOO, esta hormona experimentó una evolución al alza tras la ingesta de AOO (en el grupo de riesgo), y de AGAO y AG en ambos grupos de población. A este respecto, los resultados reportados en la literatura son algo contradictorios. Así, mientras De Melo y cols. (2010) y Rao y cols. (2011) observaron un aumento de los niveles plasmáticos de esta hormona en ratones tratados con ácido oleanólico y ácido ursólico, un estudio desarrollado por Jia y cols. (2015) mostró una disminución de los niveles de leptina tras la administración oral de ácido ursólico (50 y 200 mg/kg), en consonancia con lo observado en la presente Tesis en los voluntarios sanos tras la administración de AOO. En nuestros ensayos, la cantidad de compuestos triterpénicos aportados por el AOO en ambas intervenciones (equivalente a 8,4 mg/día de ácido oleanólico y trazas de ácido ursólico) fue significativamente menor que los administrados en los estudios mencionados, lo cual justificaría las diferencias entre nuestros resultados y los reportados por otros autores. En cualquier caso, las variaciones en estas hormonas no se tradujeron en cambios relevantes en la ingesta, a juzgar por la similar ingesta de energía y nutrientes por los participantes en ambos estudios a lo largo de la intervención dietética (Tabla 2 del artículo I y tabla 3 del artículo II).

Por último, debido a la relación ampliamente descrita entre la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno con la aterosclerosis y sus factores de riesgo (hipertensión, dislipemia, etc.), otro de los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral fue determinar el potencial efecto beneficioso del AOO frente al estrés oxidativo (Lorenzon Dos Santos y cols., 2020). A este respecto, el consumo prolongado de AOO y AGAO durante cuatro semanas indujo cambios en los niveles de MDA, un marcador de oxidación lipídica ampliamente utilizado. Según el análisis estadístico de los datos, en el grupo de sujetos sanos se observó una disminución de este biomarcador (MDA) tras la ingesta de AOO, frente a un aumento tras el consumo de AGAO. Puesto que ambos aceites tienen un contenido similar en ácido oleico, se dedujo que los efectos favorables observados en los niveles de MDA tras la ingesta de AOO se debía a los componentes bioactivos propios de este aceite vegetal. Esta interpretación reforzó lo observado por varios autores que demostraron cómo la administración de ácidos triterpénicos (ácidos oleanólico, maslínico y ursólico) (Mkhwanazi y cols., 2014; Madlala y cols., 2015; Liu y cols., 2016; Iskender y cols., 2022) y escualeno (Chen y cols., 2020) disminuían los niveles de MDA en modelos animales hipertensos, diabéticos o con un estado inflamatorio. No obstante, la

elevada dosis farmacológica de ácidos triterpénicos puros y escualeno administrada a estos animales de experimentación, así como las patologías de los modelos murinos utilizados, limitaron las posibles comparaciones con los dos ensayos clínicos recogidos en esta Tesis Doctoral. Otro aspecto importante a la hora de evaluar el estado oxidativo de los participantes fue que los tres aceites empleados en las intervenciones dietéticas son alimentos con un alto contenido en vitamina E, un nutriente que ha demostrado contribuir a la protección de las células frente al daño oxidativo (Reglamento (CEE) nº 432/2012). Así, la similitud en el contenido de vitamina E en el AOO, AGAO y AG y las altas dosis de este antioxidante proporcionadas por los tres aceites justificarían que otros biomarcadores de estado oxidativo analizados no se vieran afectados por el tratamiento dietético.

Finalmente, de manera adicional a los objetivos planteados, al final de cada ensayo clínico se decidió evaluar el grado de satisfacción de los voluntarios con los aceites empleados en cada intervención (AOO, AGAO y AG). Este punto fue abordado con gran interés porque, aunque se demostraran los beneficios para la salud del AOO, si no tenía una buena aceptación por parte de los participantes no sería una opción de compra en el mercado. Los resultados de las encuestas mostraron una mejor valoración para el AOO en términos de sabor, olor y color, siendo el preferido desde el punto de vista culinario, tanto en su aplicación en crudo, como en fritura y otras técnicas. Del mismo modo, en torno al 63-70% de los participantes afirmaron que comprarían el AOO y un 75-77% que lo recomendarían una vez finalizado el ensayo, una valoración muy superior a la recibida por los aceites de girasol (AGAO y AG). Por consiguiente, la puntuación general del AOO fue mayor a la recibida por el AGAO y AG. En definitiva, esta situación evidenció que el AOO tuvo una mejor acogida entre los participantes de ambos ensayos y que sería la primera opción de compra en el mercado en comparación con otros aceites de semilla ampliamente utilizados en nuestro país.



# CONCLUSIONES



En el marco de la presente Tesis Doctoral se han realizado los dos primeros estudios de intervención nutricional para evaluar el efecto en salud cardiovascular y patologías asociadas del consumo regular, a dosis nutricionales, de aceite de orujo de oliva, tanto en personas sanas como con riesgo cardiovascular (moderadamente hipercolesterolémicas). El análisis conjunto de los resultados obtenidos en dichos estudios comparando el aceite de orujo de oliva frente a aceites de semilla (aceite de girasol alto oleico en el primer ensayo y aceite de girasol en el segundo), permite extraer las siguientes **conclusiones**:

1. El consumo regular de aceite de orujo de oliva modula positivamente el perfil lipídico en individuos sanos y moderadamente hipercolesterolémicos, reduciendo los niveles séricos de colesterol total y LDL-C, los cuales aumentaron tras el consumo de los aceites de semilla.
2. El efecto hipolipidémico no se vio reforzado por la mejora en otros predictores de riesgo cardiovascular, al aumentar los niveles de apolipoproteína B en ambos grupos y la relación Apo B/Apo A1 en sujetos sanos con el consumo de aceite de girasol y, más discretamente, con el aceite de orujo de oliva.
3. La ingesta sostenida de aceite de orujo de oliva redujo ligeramente el perímetro de la cintura en ambos grupos de población (sujetos sanos y con riesgo cardiovascular).
4. La presión arterial y otros marcadores relacionados con la función endotelial y la inflamación se mantuvieron constantes tras el consumo regular de aceite de orujo de oliva.
5. El consumo de aceite de orujo de oliva mostró efectos beneficiosos sobre diferentes marcadores relacionados con la diabetes mellitus tipo 2, al disminuir los niveles de insulina y mejorar los indicadores de resistencia (HOMA-IR) y sensibilidad a la insulina (QUICKI) en sujetos sanos.
6. El aumento de los niveles séricos de leptina en el grupo normocolesterolémico sugiere que el consumo prolongado de aceite de orujo de oliva podría modular positivamente esta hormona implicada en la regulación del apetito y el metabolismo energético.
7. El consumo de aceite de orujo de oliva tuvo un efecto antioxidante en sujetos sanos, disminuyendo la oxidación de lípidos en suero.
8. El grado de aceptación del aceite de orujo de oliva, en términos de color, olor y sabor, así como en su aplicación en diversas técnicas culinarias, fue considerablemente mayor en comparación con los aceites de semilla.

**Conclusión general**

Se puede concluir que el consumo regular de aceite de orujo de oliva ejerce una acción cardioprotectora tanto en sujetos moderadamente hipercolesterolémicos como en población sana, pudiendo verse beneficiada esta última por adicionales efectos positivos asociados a una menor resistencia a la insulina. Teniendo en cuenta estos beneficios en salud cardiometabólica y la buena aceptación de este aceite vegetal, el aceite de orujo de oliva tiene un gran potencial como integrante de la dieta mediterránea.



# BIBLIOGRAFÍA



- Abraham, A., Kattoor, A. J., Saldeen, T., & Mehta, J. L. (2019). Vitamin E and its anticancer effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(17), 2831-2838.
- Abuobeid, R., Herrera-Marcos, L., Navarro, M. A., Arnal, C., Martínez-Beamonte, R., Surra, J., & Osada, J. (2020). Dietary erythrodiol modifies hepatic transcriptome in mice in a sex and dose-dependent way. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7331.
- Agra, L. C., Lins, M. P., da Silva Marques, P., Smaniotto, S., de Melo, C. B., Lagente, V., & Barreto, E. (2016). Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *European Journal of Pharmacology*, 780, 232-242.
- Akrami, A., Makiabadi, E., Askarpour, M., Zamani, K., Hadi, A., Mokari-Yamchi, A., Babajafari, S., Faghih, S., & Hojhabrmanesh, A. (2020). A comparative study of the effect of flaxseed oil and sunflower oil on the coagulation score, selected oxidative and inflammatory parameters in metabolic syndrome patients. *Clinical Nutrition Research*, 9(1), 63-72.
- Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J. J., Uceda, M., & Mesa, M. D. (2010). Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2885-2890.
- Andrikopoulos, N. K., Kaliora, A. C., Assimopoulou, A. N., & Papageorgiou, V. P. (2002). Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Medicinal Food*, 5(1), 1-7.
- Andrikopoulos, N. K., Kaliora, A. C., Assimopoulou, A. N., & Papageorgiou, V. P. (2003). Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytotherapy Research*, 17(5), 501-507.
- Antonopoulos, K., Valet, N., Spiratos, D., & Siragakis, G. (2006). Olive oil and pomace olive oil processing. *Grasas y Aceites*, 57(1), 56-67.

- Arija, V., Pérez, C., Martínez de Vitoria, E., Ortega, R. M., Serra-Majem, L., Ribas, L., & Aranceta, J. (2015). Valores de referencia de ingesta dietética y de antropometría en estudios poblacionales. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*, 21(1), 157-167.
- Arola-Arnal, A., Cruz-Carrión, Á., Torres-Fuentes, C., Ávila-Román, J., Aragonès, G., Mulero, M., Bravo, F. I., Muguerza, B., Arola, L., & Suárez, M. (2019). Chrononutrition and polyphenols: roles and diseases. *Nutrients*, 11(11), 2602.
- Ascaso, J. F., & Carmena, R. (2015). Importancia de la dislipidemia en la enfermedad cardiovascular: un punto de vista. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 27(6), 301-308.
- Asher, G., & Sassone-Corsi, P. (2015). Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell*, 161(1), 84-92.
- Ashwell, M., Gunn, P., & Gibson, S. (2012). Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 13(3), 275-286.
- Askarpour, M., Ghaedi, E., Roshanravan, N., Hadi, A., Mohammadi, H., Symonds, M. E., & Miraghajani, M. (2019). Policosanol supplementation significantly improves blood pressure among adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine*, 45, 89-97.
- Asociación Nacional de Empresas de Aceite de Orujo (ANEEO). (2020). *Evolución de las exportaciones de aceite de orujo de oliva en la última campaña*. Disponible online: <https://ecomercioagrario.com/evolucion-de-las-exportaciones-de-aceite-de-orujo-en-la-ultima-campana/> (consultado el 23 de noviembre de 2022).
- Bachhav, S. S., Patil, S. D., Bhutada, M. S., & Surana, S. J. (2011). Oleonic acid prevents glucocorticoid-induced hypertension in rats. *Phytotherapy Research: PTR*, 25(10), 1435-1439.
- Baynes, J., & Dominiczak, M. H. (2009). *Medical Biochemistry*. (3ª edición). Elsevier Health Sciences, Amsterdam (Países Bajos).

- Berbel, J., Gutiérrez-Martín, C., & La Cal, J.A. (2018). Valorización de los subproductos de la cadena del aceite de oliva. *Mediterráneo Económico*, 31, 273-289.
- Bin Sayeed, M. S., Karim, S., Sharmin, T., & Morshed, M. M. (2016). Critical analysis on characterization, systemic effect, and therapeutic potential of beta-sitosterol: a plant-derived orphan phytosterol. *Medicines*, 3(4), 29.
- Boer, G. A., & Holst, J. J. (2020). Incretin hormones and type 2 diabetes-mechanistic insights and therapeutic approaches. *Biology*, 9(12), 473.
- Cabello-Moruno, R., Martínez-Force, E., Montero, E., & Perona, J. S. (2014). Minor components of olive oil facilitate the triglyceride clearance from postprandial lipoproteins in a polarity-dependent manner in healthy men. *Nutrition Research*, 34(1), 40-47.
- Cabello-Moruno, R., Sinausia-Nieva, L., Montero Romero, E., Botham, K. M., Avella, M., & Perona, J. S. (2015). Minor components of pomace olive oil enhance VLDL-receptor expression in macrophages when treated with postprandial triglyceride-rich lipoproteins. *Grasas y Aceites*, 66(4), e096.
- Cabral, C. E., & Klein, M. (2017). Phytosterols in the treatment of hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 109(5), 475-482.
- Carbajal, A. (2013). *Manual de Nutrición y Dietética. Anexo: Pesos de medidas caseras y raciones habituales de consumo (por persona)* Disponible online: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2015-10-22-pesos-medidas-caseras-raciones-2015.pdf> (consultado el 08 de diciembre de 2022).
- Cárdeno, A., Aparicio-Soto, M., Montserrat-de la Paz, S., Bermudez, B., Muriana, F. J., & Alarcón-de-la-Lastra, C. (2015). Squalene targets pro-and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *Journal of Functional Foods*, 14, 779-790.
- Carnevale, R., Pignatelli, P., Nocella, C., Loffredo, L., Pastori, D., Vicario, T., Petruccioli, A., Bartimoccia, S., & Violi, F. (2014). Extra virgin olive oil blunt post-

- prandial oxidative stress via NOX2 down-regulation. *Atherosclerosis*, 235(2), 649-658.
- Carvajal-Carvajal, C. (2017). El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(2), 90-100.
- Casado-Díaz, A., Túnez-Fiñana, I., Mata-Granados, J. M., Ruiz-Méndez, M. V., Dorado, G., Romero-Sánchez, M. C., Navarro-Valverde, C., & Quesada-Gómez, J. M. (2017). Serum from postmenopausal women treated with a by-product of olive-oil extraction process stimulates osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis in human mesenchymal stem-cells (MSC). *Experimental Gerontology*, 90, 71-78.
- Casas, R., Sacanella, E., Urpí-Sardà, M., Chiva-Blanch, G., Ros, E., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Rosa Ma Lamuela-Raventos, Salas-Salvadó, J., Fiol, M., Arós, F., & Estruch, R. (2014). The effects of the Mediterranean diet on biomarkers of vascular wall inflammation and plaque vulnerability in subjects with high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. *PloS One*, 9(6), e100084.
- Castellano, J. M., Ramos-Romero, S., & Perona, J. S. (2022). Oleanolic acid: extraction, characterization and biological activity. *Nutrients*, 14(3), 623.
- Chan, P., Tomlinson, B., Lee, C. B., & Lee, Y. S. (1996). Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Pharmacology*, 36(5), 422-427.
- Chen, F. F., Wang, J. T., Zhang, L. X., Xing, S. F., Wang, Y. X., Wang, K., Deng, S. L., Zhang, J. Q., Tang, L., & Wu, H. S. (2017). Oleanolic acid derivative DKS26 exerts antidiabetic and hepatoprotective effects in diabetic mice and promotes glucagon-like peptide-1 secretion and expression in intestinal cells. *British Journal of Pharmacology*, 174(17), 2912-2928.
- Chen, Y., Gu, Y., Zhao, H., Zhang, H., & Zhou, Y. (2020). Effects of graded levels of dietary squalene supplementation on the growth performance, plasma biochemical parameters, antioxidant capacity, and meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*, 99(11), 5915-5924.

- Cicero, A. F., Nascetti, S., López-Sabater, M. C., Elosua, R., Salonen, J. T., Nyssönen, K., Poulsen, H. E., Zunft, H. J., Kiese Wetter, H., de la Torre, K., Covas, M. I., Kaikkonen, J., Mursu, J., Koenbick, C., Bäuml er, H., Gaddi, A. V., & EUROLIVE Study Group (2008). Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), 314-320.
- Civantos, L. (1999). *Obtención del Aceite de Oliva Virgen*. (2ª edición). Agrícola Española, Madrid (España).
- Claro-Cala, C. M., Jiménez-Altayó, F., Zagmutt, S., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2022). Molecular mechanisms underlying the effects of olive oil triterpenic acids in obesity and related diseases. *Nutrients*, 14(8), 1606.
- Claro-Cala, C. M., Quintela, J. C., Pérez-Montero, M., Miñano, J., de Sotomayor, M. A., Herrera, M. D., & Rodríguez-Rodríguez, A. R. (2020). Pomace olive oil concentrated in triterpenic acids restores vascular function, glucose tolerance and obesity progression in mice. *Nutrients*, 12(2), 323.
- Comisión Europea (s.f.) *El aceite de oliva en la UE*. Disponible online: [https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil\\_es](https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil_es) (consultado el 21 de abril de 2022).
- Consejería de Agricultura y Pesca-Junta de Andalucía. (2015). *Evaluación de la producción y usos de los subproductos de las agroindustrias del olivar en Andalucía*. Disponible online: [file:///C:/Users/Susana/Downloads/Subproductos-agroindustrias-olivar-def%20\(6\).pdf](file:///C:/Users/Susana/Downloads/Subproductos-agroindustrias-olivar-def%20(6).pdf) (consultado el 25 de junio de 2022).
- Consejo Oleico Internacional (COI). (2021). *Evolución del consumo de aceite de oliva y aceitunas de mesa*. Disponible online: [https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/02/NEWSLETTER\\_IOC-160\\_ES.pdf](https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/02/NEWSLETTER_IOC-160_ES.pdf) (consultado el 23 de noviembre de 2022).
- Conterno, L., Martinelli, F., Tamburini, M., Fava, F., Mancini, A., Sordo, M., Pindo, M., Martens, S., Masuero, D., Vrhovsek, U., Dal Lago, C., Ferrario, G., Morandini, M., & Tuohy, K. (2019). Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on

- the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Nutrition*, 58(1), 63-81.
- Covas, M. I., Nyyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Bäumlér, H., Nascetti, S., Salonen, J. T., Fitó, M., Virtanen, J., Marrugat, J., & EUROLIVE Study Group. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(5), 333-341.
- Cui, H., López, M., & Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(6), 338-351.
- de Jongh, S., Vissers, M. N., Rol, P., Bakker, H. D., Kastelein, J. J., & Stroes, E. S. (2003). Plant sterols lower LDL cholesterol without improving endothelial function in prepubertal children with familial hypercholesterolaemia. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 26(4), 343-351.
- de la Puerta, R., Marquez-Martin, A., Fernandez-Arche, A., & Ruiz-Gutierrez, V. (2009). Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages. *Nutrition*, 25(5), 548-554.
- de la Sierra A. (2019). New American and European hypertension guidelines, reconciling the differences. *Cardiology and Therapy*, 8(2), 157-166.
- de Melo, C. L., Queiroz, M. G., Fonseca, S. G., Bizerra, A. M., Lemos, T. L., Melo, T. S., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2010). Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chemico Biological Interactions*, 185(1), 59-65.
- Derdemezis, C. S., Filippatos, T. D., Mikhailidis, D. P., & Elisaf, M. S. (2010). Review article: effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 15(2), 120-134.
- Djeziri, F. Z., Belarbi, M., Murtaza, B., Hichami, A., Benammar, C., & Khan, N. A. (2018). Oleanolic acid improves diet-induced obesity by modulating fat preference and inflammation in mice. *Biochimie*, 152, 110-120.

- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. *EFSA Journal*, 9(4), 2033.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2012). Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to 3 g/day plant sterols/stanols and lowering blood LDL-cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 19 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 10(5), 2693.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). (2015). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as  $\alpha$ -tocopherol. *EFSA Journal*, 13(7), 4149.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F., & Giugliano, D. (2004). Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA*, 292(12), 1440-1446.
- Estruch, R., Martínez-González, M. A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Fitó, M., Chiva-Blanch, G., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., Arós, F., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Pintó, X., Buil-Cosiales, P., Sorió, J. V., Muñoz, M. A., Basora-Gallisa, J., Lamuela-Raventós, R. M., Serra-Mir, M., Ros, E., & PREDIMED Study Investigators (2019). Effect of a high-fat Mediterranean diet on bodyweight and waist circumference: a prespecified secondary outcomes analysis of the PREDIMED randomised controlled trial. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 7(5), e6-e17.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventós, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorió, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., Hernán, M. A., Martínez-González, M.A., & PREDIMED Study Investigators (2018). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *The New England Journal of Medicine*, 378(25), e34.

- Ezquerro, E. A., Vázquez, J. M. C., & Barrero, A. A. (2008). Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Revista Española de Cardiología*, 61(7), 752-764.
- Farajbakhsh, A., Mazloomi, S. M., Mazidi, M., Rezaie, P., Akbarzadeh, M., Ahmad, S. P., Ferns, G. A., Ofori-Asenso, R., & Babajafari, S. (2019). Sesame oil and vitamin E co-administration may improve cardiometabolic risk factors in patients with metabolic syndrome: a randomized clinical trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 73(10), 1403-1411.
- Federación Española de Diabetes (FEDE). (s.f). *Diagnóstico Diabetes*. Disponible online: [https://fedesp.es/diabetes/#Diagnostico\\_Diabetes](https://fedesp.es/diabetes/#Diagnostico_Diabetes) (consultado el 27 de noviembre de 2022).
- Fernández, M. H., Delgado, J. G., Ojeda, M. U., Rodríguez, A. G. O., Bernardino, J. M., Ruiz, L. F., & García, A. F. (1995) *Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por sistema de dos fases*. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- Fernández-Aparicio, Á., Schmidt-RioValle, J., Perona, J. S., Correa-Rodríguez, M., Castellano, J. M., & González-Jiménez, E. (2019). Potential protective effect of oleonic acid on the components of metabolic syndrome: a systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1294.
- Fernández-Arche, A., Marquez-Martín, A., de la Puerta Vazquez, R., Perona, J. S., Terencio, C., Perez-Camino, C., & Ruiz-Gutierrez, V. (2009). Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(3), 155-162.
- Filippou, A., Berry, S. E., Baumgartner, S., Mensink, R. P., & Sanders, T. A. (2014). Palmitic acid in the sn-2 position decreases glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in healthy adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 68(5), 549-554.
- Fitó, M., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Martínez-Gonzalez, M. A., Arós, F., Vila, J., Corella, D., Díaz, O., Sáez, G., de la Torre, R., Mitjavila, M. T., Muñoz, M. A.,

- Lamuela-Raventós, R. M., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Ros, E., Serra-Majem, L., Covas, M. I., & PREDIMED Study Investigators (2014). Effect of the Mediterranean diet on heart failure biomarkers: a randomized sample from the PREDIMED trial. *European Journal of Heart Failure*, *16*(5), 543-550.
- Fodor, A., Tipericiuc, B., Login, C., Orasan, O. H., Lazar, A. L., Buchman, C., Hanghichel, P., Sitar-Taut, A., Suharoschi, R., Vulturar, R., & Cozma, A. (2021). Endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in COVID-19-mechanisms and therapeutic targets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*, 8671713.
- Francula-Zaninovic, S., & Nola, I. A. (2018). Management of measurable variable cardiovascular disease' risk factors. *Current Cardiology Reviews*, *14*(3), 153-163.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, *18*(6), 499-502.
- Frostedgård J. (2013). Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Medicine*, *11*, 117.
- Fukumitsu, S., Villareal, M. O., Fujitsuka, T., Aida, K., & Isoda, H. (2016). Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of pentacyclic triterpenoids maslinic acid through NF- $\kappa$ B inactivation. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(2), 399-409.
- Furtado, N. A., Pirson, L., Edelberg, H., M Miranda, L., Loira-Pastoriza, C., Preat, V., Larondelle, Y., André, & C. M. (2017). Pentacyclic triterpene bioavailability: an overview of in vitro and in vivo studies. *Molecules*, *22*(3), 400.
- Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H. R., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: pathophysiology and management. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(1), 69-84.

- García-Martín, J. F., Cuevas, M., Feng, C. H., Álvarez Mateos, P., Torres García, M., & Sánchez, S. (2020). Energetic valorisation of olive biomass: olive-tree pruning, olive stones and pomaces. *Processes*, 8(5), 511.
- Giacometti, J. (2001). Determination of aliphatic alcohols, squalene, alpha-tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *The Analyst*, 126(4), 472-475.
- Gimbrone, M. A., & García-Cardena, G. (2016). Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 620-636.
- González-Garibay, A. S., López-Vázquez, A., García-Bañuelos, J., Sánchez-Enríquez, S., Sandoval-Rodríguez, A. S., Del Toro Arreola, S., Bueno-Topete, M. R., Muñoz-Valle, J. F., González Hita, M. E., Domínguez-Rosales, J. A., Armendáriz-Borunda, J., & Bastidas-Ramírez, B. E. (2020). Effect of ursolic acid on insulin resistance and hyperinsulinemia in rats with diet-induced obesity: role of adipokines expression. *Journal of Medicinal Food*, 23(3), 297-304.
- González-Muniesa, P., & Martínez, J. A. (2019). Precision nutrition and metabolic syndrome management. *Nutrients*, 11(10), 2411.
- Graham, V. S., Lawson, C., Wheeler-Jones, C. P., Perona, J. S., Ruiz-Gutierrez, V., & Botham, K. M. (2012). Triacylglycerol-rich lipoproteins derived from healthy donors fed different olive oils modulate cytokine secretion and cyclooxygenase-2 expression in macrophages: the potential role of oleanolic acid. *European Journal of Nutrition*, 51(3), 301-309.
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramírez-Tortosa, C. L., Ochoa-Herrera, J., Pérez-López, P., Pulido-Moran, M., & Ramírez-Tortosa, M. C. (2012). Squalene ameliorates atherosclerotic lesions through the reduction of CD36 scavenger receptor expression in macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(5), 733-740.
- Guallar-Castillón, P., Gil-Montero, M., León-Muñoz, L. M., Graciani, A., Bayán-Bravo, A., Taboada, J. M., Banegas, J. R., & Rodríguez-Artalejo, F. (2012). Magnitude

- and management of hypercholesterolemia in the adult population of Spain, 2008-2010: The ENRICA Study. *Revista Española de Cardiología*, 65(6), 551-558.
- Guasch-Ferré, M., Hu, F. B., Martínez-González, M. A., Fitó, M., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Corella, D., Recondo, J., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Muñoz, M. A., Pintó, X., Lamuela-Raventós, R. M., Basora, J., Buil-Cosiales, P., Sorlí, J. V., Ruiz-Gutiérrez, V., Martínez, J. A., & Salas-Salvadó, J. (2014). Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine*, 12, 78.
- Gullón, B., Gullón, P., Eibes, G., Cara, C., De Torres, A., López-Linares, J. C., Ruiz, E., & Castro, E. (2018). Valorisation of olive agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds. *The Science of the Total Environment*, 645, 533-542.
- Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Research International*, 137, 109683.
- Hamedi-Kalajahi, F., Zarezadeh, M., Dehghani, A., Musazadeh, V., Kolahi, A., Shabbidar, S., & Djafarian, K. (2021). A systematic review and meta-analysis on the impact of oral vitamin E supplementation on apolipoproteins A1 and B100. *Clinical Nutrition ESPEN*, 46, 106-114.
- Hansel, B., Courie, R., Bayet, Y., Delestre, F., & Bruckert, E. (2011). Phytostérols et athérosclérose [Phytosterols and atherosclerosis]. *La Revue de Médecine Interne*, 32(2), 124-129.
- Hargrove, J. L., Greenspan, P., & Hartle, D. K. (2004). Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Experimental Biology and Medicine*, 229(3), 215-226.
- Hernández, Á., Castañer, O., Goday, A., Ros, E., Pintó, X., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Corella, D., Arós, F., Serra-Majem, L., Martínez-González, M. Á., Fiol, M., Lapetra, J., de la Torre, R., López-Sabater, M. C., & Fitó, M. (2017). The Mediterranean Diet decreases LDL atherogenicity in high cardiovascular risk

- individuals: a randomized controlled trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(9), 1601015.
- Ho, S. S., & Pal, S. (2005). Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells. *Atherosclerosis*, 182(1), 29-36.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444.
- Huang, D., Refaat, M., Mohammedi, K., Jayyousi, A., Al Suwaidi, J., Abi Khalil, C. (2017). Macrovascular complications in patients with diabetes and prediabetes. *BioMed Research International*, 2017, 7839101.
- Huang, L., Guan, T., Qian, Y., Huang, M., Tang, X., Li, Y., Sun, H. (2011). Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *European Journal of Pharmacology*, 672(1-3), 169-174.
- Hussain Shaik, A., Rasool, S. N., Abdul Kareem, M., Krushna, G. S., Akhtar, P. M., & Devi, K. L. (2012). Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *Journal of Medicinal Food*, 15(8), 741-746.
- Ibrahim, N., Fairus, S., Zulfarina, M. S., & Naina Mohamed, I. (2020). The efficacy of squalene in cardiovascular disease risk-a systematic review. *Nutrients*, 12(2), 414.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2019). *Defunciones según la Causa de Muerte Año 2018* [Comunicado de prensa]. Disponible online: [https://www.ine.es/prensa/edcm\\_2018.pdf](https://www.ine.es/prensa/edcm_2018.pdf) (consultado el 23 de noviembre de 2022).
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (s.f). *Mujeres y Hombres en España*. Disponible online: [https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es\\_ES&c=INEPublicacion\\_C&cid=125992482](https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=INEPublicacion_C&cid=125992482)

2888&p=1254735110672&pagename=ProductosYServicios/PYSLayout&param1=PYSDetalleGratis&param4=Ocultar (consultado el 23 de noviembre de 2022).

- Iskender, H., Dokumacioglu, E., Terim Kapakin, K. A., Yenice, G., Mohtare, B., Bolat, I., & Hayirli, A. (2022). Effects of oleanolic acid on inflammation and metabolism in diabetic rats. *Biotechnic & Histochemistry*, *97*(4), 269-276.
- Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F., & Carreira, M. C. (2019). Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients*, *11*(11), 2704.
- Jang, S. M., Yee, S. T., Choi, J., Choi, M. S., Do, G. M., Jeon, S. M., Yeo, J., Kim, M. J., Seo, K. I., & Lee, M. K. (2009). Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *International Immunopharmacology*, *9*(1), 113-119.
- Jesus, J. A., Lago, J. H., Laurenti, M. D., Yamamoto, E. S., & Passero, L. F. (2015). Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 620472.
- Jia, Y., Kim, S., Kim, J., Kim, B., Wu, C., Lee, J. H., Jun, H. J., Kim, N., Lee, D., & Lee, S. J. (2015). Ursolic acid improves lipid and glucose metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hepatic autophagy. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*(2), 344-354.
- Joe, P. (2018). Global edible vegetable oil market trends. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, *2*(1), 2282-2291.
- Joris, P. J., & Mensink, R. P. (2016). Role of cis-monounsaturated fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Current Atherosclerosis Reports*, *18*(7), 38.
- Kanikowska, D., Sato, M., & Witowski, J. (2015). Contribution of daily and seasonal biorhythms to obesity in humans. *International Journal of Biometeorology*, *59*(4), 377-384.
- Kashyap, D., Sharma, A., Tuli, H. S., Punia, S., & Sharma, A. K. (2016). Ursolic acid and oleanolic acid: pentacyclic terpenoids with promising anti-inflammatory activities. *Recent Patents on Inflammation Allergy Drug Discovery*, *10*(1), 21-33.

- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., & Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(7), 2402-2410.
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 320(3), C375-C391.
- Keys, A., Aravanis, C., Blackburn, H. W., Van Buchem, F. S., Buzina, R., Djordjević, B. D., Dontas, A. S., Fidanza, F., Karvonen, M. J., Kimura, N., Lekos, D., Monti, M., Puddu, V., & Taylor, H. L. (1966). Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. *Acta Medica Scandinavica Supplementum*, 460, 1-392.
- Khandouzi, N., Zahedmehr, A., & Nasrollahzadeh, J. (2021). Effect of polyphenol-rich extra-virgin olive oil on lipid profile and inflammatory biomarkers in patients undergoing coronary angiography: a randomised, controlled, clinical trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(4), 548-558.
- Khathi, A., Serumula, M. R., Myburg, R. B., Van Heerden, F. R., & Musabayane, C. T. (2013). Effects of *Syzygium aromaticum*-derived triterpenes on postprandial blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats following carbohydrate challenge. *PloS One*, 8(11), e81632.
- Khwaza, V., Oyedeji, O. O., & Aderibigbe, B. A. (2020). Ursolic acid-based derivatives as potential anti-cancer agents: an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5920.
- Kim, H. S., Han, S. Y., Sung, H. Y., Park, S. H., Kang, M. K., Han, S. J., & Kang, Y. H. (2014). Blockade of visfatin induction by oleanolic acid via disturbing IL-6-TRAF6-NF- $\kappa$ B signaling of adipocytes. *Experimental Biology and Medicine*, 239(3), 284-292.
- Kim, S. K., & Karadeniz, F. (2012). Biological importance and applications of squalene and squalane. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 223-233.

- Koch, K., & Barthlott, W. (2006). Plant epicuticular waxes: chemistry, form, self-assembly and function. *Natural Product Communications*, 1(11), 1067-1072.
- Labrador, N., Mateos, J., & Moya, P. (2017). *Tomo V Patología Cardiovascular*. (1ª edición). Ratio Legis, Salamanca (España).
- Lacroix, S., Cantin, J., & Nigam, A. (2017). Contemporary issues regarding nutrition in cardiovascular rehabilitation. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 60(1), 36-42.
- Lahoz, C., & Mostaza, J. M. (2007). La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Revista Española de Cardiología*, 60(2), 184-195.
- Lambert, E. V., Goedecke, J. H., Bluett, K., Heggie, K., Claassen, A., Rae, D. E., West, S., Dugas, J., Dugas, L., Meltzer, S., Charlton, K., & Mohede, I. (2007). Conjugated linoleic acid versus high-oleic acid sunflower oil: effects on energy metabolism, glucose tolerance, blood lipids, appetite and body composition in regularly exercising individuals. *The British Journal of Nutrition*, 97(5), 1001-1011.
- Lasa, A., Miranda, J., Bulló, M., Casas, R., Salas-Salvadó, J., Larretxi, I., Estruch, R., Ruiz-Gutiérrez, V., & Portillo, M. P. (2014). Comparative effect of two Mediterranean diets versus a low-fat diet on glycaemic control in individuals with type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 68(7), 767-772.
- Lee, W., Yang, E. J., Ku, S. K., Song, K. S., & Bae, J. S. (2013). Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Inflammation*, 36(1), 94-102.
- Leighton, E., Sainsbury, C. A., & Jones, G. C. (2017). A practical review of C-peptide testing in diabetes. *Diabetes Therapy*, 8(3), 475-487.
- Liu, B., Piao, X., Guo, L., Liu, S., Chai, F., & Gao, L. (2016). Ursolic acid protects against ulcerative colitis via anti-inflammatory and antioxidant effects in mice. *Molecular Medicine Reports*, 13(6), 4779-4785.
- Liu, C. H., Huang, X. T., Li, Y. Y., Zheng, X., Li, N., Mi, S. Q., & Wang, N. S. (2012). The anti-portal hypertension effect of oleanolic acid in CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis rats. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 35(6), 930-935.

- Liu, J., Sun, H., Wang, X., Mu, D., Liao, h., & Zhang, L. (2007). Effects of oleanolic acid and maslinic acid on hyperlipidemia. *Drug Development Research*, 68(5), 261-266.
- Liu, Y., Xu, X., Bi, D., Wang, X., Zhang, X., Dai, H., Chen, S., & Zhang, W. (2009). Influence of squalene feeding on plasma leptin, testosterone blood pressure in rats. *The Indian Journal of Medical Research*, 129(2), 150-153.
- Lo, S. H., Li, Y., Cheng, K. C., Niu, C. S., Cheng, J. T., & Niu, H. S. (2017). Ursolic acid activates the TGR5 receptor to enhance GLP-1 secretion in type 1-like diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(11), 1097-1104.
- Lombardo, L., Grasso, F., Lanciano, F., Loria, S., & Monetti, E. (2018). Broad-spectrum health protection of extra virgin olive oil compounds. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 41-77.
- Lorenzon Dos Santos, J., Quadros, A. S., Weschenfelder, C., Garofallo, S. B., & Marcadenti, A. (2020). Oxidative stress biomarkers, nut-related antioxidants, and cardiovascular disease. *Nutrients*, 12(3), 682.
- Lovic, D., Piperidou, A., Zografou, I., Grassos, H., Pittaras, A., & Manolis, A. (2020). The growing epidemic of diabetes mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 18(2), 104-109.
- Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., & Martínez-Ayala, A. L. (2018). Plant sources, extraction methods, and uses of squalene. *International Journal of Agronomy*, 2018.
- Luna-Vázquez, F. J., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Romo-Mancillas, A., López-Vallejo, F. H., Solís-Gutiérrez, M., Rojas-Molina, J. I., & Rivero-Cruz, F. (2016). Role of nitric oxide and hydrogen sulfide in the vasodilator effect of ursolic acid and uvaol from black cherry prunus serotina fruits. *Molecules*, 21(1), 78.
- Madlala, H. P., Van Heerden, F. R., Mubagwa, K., & Musabayane, C. T. (2015). Changes in renal function and oxidative status associated with the hypotensive effects of oleanolic acid and related synthetic derivatives in experimental animals. *PloS One*, 10(6), e0128192.

- Makris, M. C., Alexandrou, A., Papatsoutsos, E. G., Malietzis, G., Tsilimigras, D. I., Guerron, A. D., & Moris, D. (2017). Ghrelin and obesity: identifying gaps and dispelling myths. a reappraisal. *In vivo*, *31*(6), 1047-1050.
- Manach, C., Milenkovic, D., Van de Wiele, T., Rodriguez-Mateos, A., de Roos, B., Garcia-Conesa, M. T., Landberg, R., Gibney, E. R., Heinonen, M., Tomás-Barberán, F., & Morand, C. (2017). Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives: towards a better understanding of their role in healthy aging and cardiometabolic risk reduction. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(6), 1600557.
- Manzanares, P., Ruiz, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., Gallego, F.J., Linares, J.C.L., & Castro, E. (2017). Residual biomass potential in olive tree cultivation and olive oil industry in Spain: valorization proposal in a biorefinery context. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *15*(3), e0206.
- Marchal, P. C., Ortega, J. G., Puerto, D. A., & García, J. G. (2011). Situación actual y perspectivas futuras del control del proceso de elaboración del aceite de oliva virgen. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, *8*(3), 258-269.
- Márquez-Díaz, R. R. (2016). Obesidad: prevalencia y relación con el nivel educativo en España. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, *36*(3), 181-188.
- Martínez-Beamonte, R., Sanclemente, T., Surra, J. C., & Osada, J. (2020). Could squalene be an added value to use olive by-products? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(3), 915-925.
- Martirosyan, D. M., Miroshnichenko, L. A., Kulakova, S. N., Pogojeva, A. V., & Zoloedov, V. I. (2007). Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids in Health and Disease*, *6*, 1.
- Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M. A., Calabriso, N., Santarpino, G., Verri, T., & De Caterina, R. (2020). Effects of olive oil on blood pressure: epidemiological, clinical, and mechanistic evidence. *Nutrients*, *12*(6), 1548.

- Mataix, J., & Gil, A. (2004). *Libro Blanco de los Omega-3. Los Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega 3 y Monoinsaturados Tipo Oleico y su Papel en Salud*. (1ª edición). Panamericana, Madrid (España).
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., & Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185-2192.
- Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L., & Bravo, L. (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 827(1), 76-82.
- Mateos, R., Sarriá, B., Bravo, L. (2020). Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(20), 3506-3521.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Medina-Remón, A., Tresserra-Rimbau, A., Pons, A., Tur, J. A., Martorell, M., Ros, E., Buil-Cosiales, P., Sacanella, E., Covas, M. I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Ortega-Calvo, M., García-Valdúeza, M., Arós, F., Saez, G. T., Serra-Majem, L., Pinto, X., Vinyoles, E., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., & PREDIMED Study Investigators. (2015). Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 25(1), 60-67.

- Menéndez, E., Delgado, E., Fernández-Vega, F., Prieto, M. A., Bordiú, E., Calle, A., Carmena, R., Cataño, L., Catalá, M., & Franch, J. (2016). Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. Resultados del estudio Di@ bet.es. *Revista Española de Cardiología*, 69(6), 572-578.
- Micera, M., Botto, A., Geddo, F., Antoniotti, S., Bertea, C. M., Levi, R., Gallo, M. P., & Querio, G. (2020). Squalene: more than a step toward sterols. *Antioxidants* 9(8), 688.
- Miettinen, T. A., & Vanhanen, H. (1994). Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(2), 356-363.
- Milenkovic, D., Morand, C., Cassidy, A., Konic-Ristic, A., Tomás-Barberán, F., Ordovas, J. M., Kroon, P., De Caterina, R., & Rodriguez-Mateos, A. (2017). Interindividual variability in biomarkers of cardiometabolic health after consumption of major plant-food bioactive compounds and the determinants involved. *Advances in Nutrition*, 8(4), 558-570.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2021). Consumo y tendencias en alimentación. Disponible online: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/consumo-aceite.aspx> (consultado el 23 de noviembre de 2022).
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (s.f). *Aceite de oliva y aceituna de mesa*. Disponible online: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/> (consultado el 5 julio de 2022).
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO). (2019). *Análisis de la consideración como subproducto del orujo graso húmedo procedente de la elaboración de aceite de oliva y destinado a la extracción de aceite de orujo de oliva*. Disponible online: [https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/participacion-publica/estudiosubproductoalperujo\\_191120\\_tcm30-506764.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/participacion-publica/estudiosubproductoalperujo_191120_tcm30-506764.pdf) (consultado el 5 de mayo de 2022).

- Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Itaya, M., Nakagawa, K., & Miyazawa, T. (2019). Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*, *71*(4), 430-441.
- Mkhwanazi, B. N., Serumula, M. R., Myburg, R. B., Van Heerden, F. R., & Musabayane, C. T. (2014). Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function. *Renal Failure*, *36*(3), 419-431.
- Mo, S. Y., Lai, O. M., Chew, B. H., Ismail, R., Bakar, S. A., Jabbar, N. A., & Teng, K. T. (2019). Interesterified palm olein lowers postprandial glucose-dependent insulinotropic polypeptide response in type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, *58*(5), 1873-1885.
- Mohd Zaffarin, A. S., Ng, S. F., Ng, M. H., Hassan, H., & Alias, E. (2020). Pharmacology and pharmacokinetics of vitamin e: nanoformulations to enhance bioavailability. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 9961-9974.
- Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2011). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, *9*(1), 36-42.
- Montaruli, A., Castelli, L., Mulè, A., Scurati, R., Esposito, F., Galasso, L., & Roveda, E. (2021). Biological rhythm and chronotype: new perspectives in health. *Biomolecules*, *11*(4), 487.
- Morand, C., De Roos, B., Garcia-Conesa, M. T., Gibney, E. R., Landberg, R., Manach, C., Milenkovic, D., Rodriguez-Mateos, A., Van de Wiele, T., & Tomas-Barberan, F. (2020). Why interindividual variation in response to consumption of plant food bioactives matters for future personalised nutrition. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *79*(2), 225-235.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2016). *Tablas de Composición de Alimentos (18ª Edición)*. Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, SA)
- Murcia, J.L. (2010). Aceites de semillas: palma, colza, soja y girasol lideran la producción y el consumo mundial. Mercasa. Disponible online

[https://www.mercasa.es/media/publicaciones/58/pag\\_065-070\\_Murcia.pdf](https://www.mercasa.es/media/publicaciones/58/pag_065-070_Murcia.pdf)

(consultado el 12 de junio de 2022).

- Nocella, C., Cammisotto, V., Fianchini, L., D'Amico, A., Novo, M., Castellani, V., Stefanini, L., Violi, F., & Carnevale, R. (2018). Extra virgin olive oil and cardiovascular diseases: benefits for human health. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 18(1), 4-13.
- Noweck, K., & Grafahrend, W. (2006). Fatty alcohols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 14, 14.
- Oike, H., Oishi, K., & Kobori, M. (2014). Nutrients, clock genes, and chrononutrition. *Current Nutrition Reports*, 3(3), 204-212
- Organización Internacional de Normalización. (2016). Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación de los contenidos de tocoferol y tocotrienol mediante cromatografía líquida de alta resolución. (ISO 9936:2016).
- Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2018). Palmitic and oleic acid: the yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(3), 178-190.
- Pastor, R., Bouzas, C., & Tur, J. A. (2021). Beneficial effects of dietary supplementation with olive oil, oleic acid, or hydroxytyrosol in metabolic syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 172, 372-385.
- Pell, J. P., & Cobbe, S. M. (1999). Seasonal variations in coronary heart disease. *QJM: An International Journal of Medicine*, 92(12), 689-696.
- Pérez-Camino, M.C., & Cert, A. (1999). Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1558-1562.
- Pérez-Martínez, P., García-Quintana, J. M., Yubero-Serrano, E. M., Tasset-Cuevas, I., Tunez, I., García-Ríos, A., Delgado-Lista, J., Marín, C., Pérez-Jiménez, F., Roche, H. M., & Lopez-Miranda, J. (2010). Postprandial oxidative stress is modified by

- dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clinical Science*, 119(6), 251-261.
- Perona, J. S., Arcemis, C., Ruiz-Gutierrez, V., & Catalá, A. (2005). Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 730-735.
- Péter, S., Friedel, A., Roos, F. F., Wyss, A., Eggersdorfer, M., Hoffmann, K., & Weber, P. (2015). A systematic review of global alpha-tocopherol status as assessed by nutritional intake levels and blood serum concentrations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 85(5-6), 261-281.
- Pineda, A. J. (2015). Interpretación de pruebas diabetológicas poco usuales para la Atención Primaria. *Diabetes Práctica*, 6, 151.
- Popa, O., Băbeanu, N. E., Popa, I., Niță, S., & Dinu-Pârvu, C. E. (2015). Methods for obtaining and determination of squalene from natural sources. *BioMed Research International*, 2015.
- Powell-Wiley, T. M., Poirier, P., Burke, L. E., Després, J. P., Gordon-Larsen, P., Lavie, C. J., Lear, S. A., Ndumele, C. E., Neeland, I. J., Sanders, P., St-Onge, M. P., & American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council. (2021). Obesity and cardiovascular disease: a scientific statement from the American heart association. *Circulation*, 143(21), e984-e1010.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Qian, X. P., Zhang, X. H., Sun, L. N., Xing, W. F., Wang, Y., Sun, S. Y., Ma, M. Y., Cheng, Z. P., Wu, Z. D., Xing, C., Chen, B. N., & Wang, Y. Q. (2021). Corosolic acid and its structural analogs: A systematic review of their biological activities and underlying mechanism of action. *Phytomedicine*, 91, 153696.

- Quilez, J., García-Lorda, P., & Salas-Salvadó, J. (2003). Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, 22(4), 343-351.
- Ramos-López, O., Milagro, F. I., Allayee, H., Chmurzynska, A., Choi, M. S., Curi, R., De Caterina, R., Ferguson, L. R., Goni, L., Kang, J. X., Kohlmeier, M., Marti, A., Moreno, L. A., Pérusse, L., Prasad, C., Qi, L., Reifen, R., Riezu-Boj, J. I., San-Cristobal, R., Santos, J. L., & Martínez, J. A. (2017). Guide for current nutrigenetic, nutrigenomic, and nutriepigenetic approaches for precision nutrition involving the prevention and management of chronic diseases associated with obesity. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 10(1-2), 43-62.
- Rao, V. S., de Melo, C. L., Queiroz, M. G., Lemos, T. L., Menezes, D. B., Melo, T. S., & Santos, F. A. (2011). Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from *Sambucus australis*, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet. *Journal of Medicinal Food*, 14(11), 1375-1382
- Ravera, A., Carubelli, V., Sciatti, E., Bonadei, I., Gorga, E., Cani, D., Vizzardì, E., Metra, M., & Lombardi, C. (2016). Nutrition and cardiovascular disease: finding the perfect recipe for cardiovascular health. *Nutrients*, 8(6), 363.
- Razmkon, A., Sadidi, A., Sherafat-Kazemzadeh, E., Mehrafshan, A., Jamali, M., Malekpour, B., & Saghafinia, M. (2011). Administration of vitamin C and vitamin E in severe head injury: a randomized double-blind controlled trial. *Clinical Neurosurgery*, 58, 133-137.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Real Decreto No 760/2021, de 31 de agosto, por el que se aprueba la norma de calidad de los aceites de oliva y de orujo de oliva. *Boletín Oficial del Estado*, 209, de 1 de septiembre de 2021.

- Recinella, L., Orlando, G., Ferrante, C., Chiavaroli, A., Brunetti, L., & Leone, S. (2020). Adipokines: New potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases. *Frontiers in Physiology, 11*, 578966.
- Reglamento (CE) No 1019/2002 de la Comisión, de 13 de junio de 2002, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L155/27*, de 14 de junio de 2002.
- Reglamento (CE) No 1513/2001 del Consejo, de 23 de julio de 2001, que modifica el Reglamento nº 136/66/CEE y el Reglamento (CE) nº 1638/98, en lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L201/4*, de 23 de julio de 2001.
- Reglamento (CEE) No 2568/91 de la Comisión, de 11 de junio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L248/1*, de 5 de septiembre de 1991.
- Reglamento (CEE) No 356/92 del Consejo, de 10 de febrero de 1992, que modifica el Reglamento nº 136/66/CEE por el que se establece la organización común de mercados en el sector de las materias grasas. *Diario Oficial de la Unión Europea, 1996, L39/1*, de 10 de febrero de 1996.
- Reglamento (UE) No 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. *Diario Oficial de la Unión Europea, L295/1*, de 12 de noviembre 2011.
- Reglamento (UE) No 432/2012 de la comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea, L 136/1*, de 25 de mayo de 2012.

- Reyes Sanamé, F. A., Pérez Álvarez, M. L., Alfonso Figueredo, E., Ramírez Estupiñan, M., & Jiménez Rizo, Y. (2016). Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *Correo Científico Médico*, 20(1), 98-121.
- Rodríguez-Rodríguez R. (2015). Oleanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 22(11), 1414-1425.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Herrera, M. D., de Sotomayor, M. A., & Ruiz-Gutiérrez, V. (2007). Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *American Journal of Hypertension*, 20(7), 728-734.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Herrera, M. D., de Sotomayor, M. A., & Ruiz-Gutiérrez, V. (2009). Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *The British Journal of Nutrition*, 102(10), 1435-1444.
- Ros, E., López-Miranda, J., Picó, C., Rubio, M. Á., Babio, N., Sala-Vila, A., Pérez-Jiménez, F., Escrich, E, Bulló, M., Pérez-Jiménez, F., Sala-Vila, A., Solanas, M., Gil-Hernández, A., & Salas-Salvado, J. (2015). Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta: postura de la Federación Española de Sociedades de Alimentación, Nutrición y Dietética (FESNAD). *Nutrición Hospitalaria*, 32(2), 435-477.
- Ruíz-Méndez, M., Dobarganes, M.C., & Sánchez Moral, P. (2010). Aceite de orujo de oliva comestible concentrado en ácidos triterpénicos, procedimiento de refinación física utilizado para su obtención y recuperación de los componentes funcionales presentes en el aceite crudo. Patente. ES2332977B1.
- Ruiz-Ramos, M., Escolar-Pujolar, A., Mayoral-Sánchez, E., Corral-San Laureano, F., & Fernández-Fernández, I. (2006). La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. *Gaceta Sanitaria*, 20, 15-24.

- Şahin, S., & Bilgin, M. (2018). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1271-1279.
- Sales-Campos, H., Souza, P. R., Peghini, B. C., da Silva, J. S., & Cardoso, C. R. (2013). An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(2), 201-210.
- Sánchez-Moral, P., & Ruíz-Méndez, M.V. (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites*, 57(1), 47-55.
- Sánchez-Rodríguez, E., & Mesa, M.D. (2018). Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica en Medicina*, 12(2), 80-94.
- Sánchez-Rodríguez, E., Vázquez-Aguilar, L. A., Biel-Glesson, S., Fernández-Navarro, J. R., Espejo-Calvo, J. A., Olmo-Peinado, J. M., de la Torre, R., Fito-Colomer, M., Covas, M. I., Romero, C., Brenes, M., Martínez de Victoria, E., Gil, A., & Mesa, M. D. (2021). May bioactive compounds from the olive fruit improve the postprandial insulin response in healthy adults? *Journal of Functional Foods*, 83, 104561.
- Santangelo, C., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Filardi, T., Fogliano, V., D'Archivio, M., Giovannini, C., Lenzi, A., Morano, S., & Masella, R. (2016). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(11), 1295-1301.
- Santos-Lozano, J. M., Rada, M., Lapetra, J., Guinda, Á., Jiménez-Rodríguez, M. C., Cayuela, J. A., Ángel-Lugo, A., Vilches-Arenas, Á., Gómez-Martín, A. M., Ortega-Calvo, M., & Castellano, J. M. (2019). Prevention of type 2 diabetes in prediabetic patients by using functional olive oil enriched in oleanolic acid: The PREDIABOLE study, a randomized controlled trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 21(11), 2526-2534.
- Sato, Y., Fujimoto, S., Toida, T., Nakagawa, H., Yamashita, Y., Iwakiri, T., Fukuda, A., & Iwatsubo, S. (2016). Apoprotein B/Apoprotein A-1 ratio and mortality among

- prevalent dialysis patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(5), 840-846.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Singh, D. K., Li, L., & Porter, T. D. (2006). Policosanol inhibits cholesterol synthesis in hepatoma cells by activation of AMP-kinase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1020-1026.
- Smith, T.J. (2000). Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(8), 1841-1848.
- Somova, L. O., Nadar, A., Rammanan, P., & Shode, F. O. (2003). Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, 10(2-3), 115-121.
- Sovetkina, A., Nadir, R., Fung, J., Nadjarpour, A., & Beddoe, B. (2020). The physiological role of ghrelin in the regulation of energy and glucose homeostasis. *Cureus*, 12(5), e7941.
- Sozen, E., Demirel, T., & Ozer, N. K. (2019). Vitamin E: regulatory role in the cardiovascular system. *IUBMB Life*, 71(4), 507-515.
- Stiti, N., Triki, S., & Hartmann, M. A. (2007). Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids*, 42(1), 55-67.
- Storniolo, C. E., Casillas, R., Bulló, M., Castañer, O., Ros, E., Sáez, G. T., Toledo, E., Estruch, R., Ruiz-Gutiérrez, V., Fitó, M., Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Mitjavila, M. T., & Moreno, J. J. (2017). A Mediterranean diet supplemented with extra virgin olive oil or nuts improves endothelial markers involved in blood pressure control in hypertensive women. *European Journal of Nutrition*, 56(1), 89-97.
- Strandberg, T. E., Tilvis, R. S., & Miettinen, T. A. (1989). Variations of hepatic cholesterol precursors during altered flows of endogenous and exogenous squalene in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1001(2), 150-156.

- Strandberg, T. E., Tilvis, R. S., & Miettinen, T. A. (1990). Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. *Journal of Lipid Research*, *31*(9), 1637-1643.
- Tholstrup, T., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Petersen, M., Høy, C. E., Lund, P., & Sandström, B. (2004). Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(4), 564-569.
- Trautwein, E. A., & McKay, S. (2020). The role of specific components of a plant-based diet in management of dyslipidemia and the impact on cardiovascular risk. *Nutrients*, *12*(9), 2671.
- Traversa, M. A., & Elbert, A. (2009). Dislipidemia, diabetes tipo 2 y enfermedad renal. Aspectos fisiopatológicos y terapéuticos. *Separata Línea Montpellier*, *17*(2).
- Tsujimoto M. (1916) A highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil. *Journal of Industrial Engineering Chemistry*, *8*, 889-896.
- Ugarte, P. A., Bengoa, R., & Gabriel, R. (2022). La situación de las enfermedades cardiovasculares en España. Principales factores de riesgo e impacto en la gestión de las enfermedades crónicas. *Documentos de Trabajo (Laboratorio de Alternativas)*, *1* (211), 1.
- Valdés, M., Calzada, F., & Mendieta-Wejebe, J. (2019). Structure-activity relationship study of acyclic terpenes in blood glucose levels: potential  $\alpha$ -glucosidase and sodium glucose cotransporter (SGLT-1) inhibitors. *Molecules*, *24*(22), 4020.
- Valerio, M., & Awad, A. B. (2011).  $\beta$ -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *International Immunopharmacology*, *11*(8), 1012-1017.
- Valero-Muñoz, M., Martín-Fernández, B., Ballesteros, S., de la Fuente, E., Quintela, J. C., Lahera, V., & de las Heras, N. (2014). Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: mechanisms involved. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*(2), 376-383.

- Vance, D. E., & Vance, J. E. (Editores) (2002). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (4ª edición). Elsevier, Amsterdam (Países Bajos).
- Varady, K. A., Wang, Y., & Jones, P. J. (2003). Role of policosanols in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Nutrition Reviews*, 61(11), 376-383.
- Vega, A. M. (2016). *Obtención de Aceites de Oliva Refinados* (1ª Edición). Ediciones Paraninfo, SA., Madrid (España).
- Verdú, F. J. M. (2009). *Nutrición y Alimentación Humana*. (2ª edición). Ergon, Madrid (España).
- Visioli, F., Loffredo, L., Pignatelli, P., Angelico, F., Bartimoccia, S., Nocella, C., Cangemi, R., Petruccioli, A., Monticolo, R., Pastori, D., & Carnevale, R. (2015). Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutrition & Diabetes*, 5(7), e172.
- Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D., & Morelo Dal Bosco, S. (2014). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 1427-1433.
- Wang, X., Liu, R., Zhang, W., Zhang, X., Liao, N., Wang, Z., Li, W., Qin, X., & Hai, C. (2013). Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 376(1-2), 70-80.
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 12(4), 331-342.
- Wells, B., Dipiro, J., Schwinghammer, T., & Dipiro, C. (2015). *Pharmacotherapy Handbook*. (Novena edición). Editorial Nueva York: Mc Graw Hill Education Medical.
- Wen, W.L. (2007). Seasonal changes in preprandial glucose, A1C, and blood pressure in diabetic patients. *Diabetes Care*, 30(10), 2501-2502.

- Xi, Y., Bao, H., Han, K., Qiao, L., Xu, X., Zhu, H., Yan, T., Niu, L., Hang, G., Wang, W., & Zhang, X. (2020a). Evaluating the treatment and control of modifiable cardiovascular disease risk factors among patients with diabetes in the Inner Mongolia, China: A cross-sectional study. *Preventive Medicine, 139*, 106174.
- Xi, Y., Niu, L., Cao, N., Bao, H., Xu, X., Zhu, H., Yan, T., Zhang, N., Qiao, L., Han, K., Hang, G., Wang, W., & Zhang, X. (2020b). Prevalence of dyslipidemia and associated risk factors among adults aged  $\geq 35$  years in northern China: a cross-sectional study. *BMC Public Health, 20*(1), 1068.
- Yahay, M., Heidari, Z., Allameh, Z., & Amani, R. (2021). The effects of canola and olive oils consumption compared to sunflower oil, on lipid profile and hepatic steatosis in women with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Lipids in Health and Disease, 20*(1), 7.
- Yubero-Serrano, E. M., Fernández-Gandara, C., García-Ríos, A., Rangel-Zúñiga, O. A., Gutiérrez-Mariscal, F. M., Torres-Peña, J. D., Marín, C., López-Moreno, J., Castaño, J. P., Delgado-Lista, J., Ordovas, J. M., Pérez-Martínez, P., & López-Miranda, J. (2020). Mediterranean diet and endothelial function in patients with coronary heart disease: An analysis of the CORDIOPREV randomized controlled trial. *PLoS Medicine, 17*(9), e1003282.
- Yubero-Serrano, E. M., López-Moreno, J., Gómez-Delgado, F., & López-Miranda, J. (2019). Extra virgin olive oil: more than a healthy fat. *European Journal of Clinical Nutrition, 72*(1), 8-17.
- Zeisel S. H. (2020). Precision (personalized) nutrition: understanding metabolic heterogeneity. *Annual Review of Food Science and Technology, 11*, 71-92.
- Zhang, W., Men, X., & Lei, P. (2014). Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *Journal of Cancer Research and Therapeutics, 10*(1), 14-19.
- Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., Tang, D., & Chen, R. (2018). Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation. *Biomolecules, 8*(3), 80.

Zingg J. M. (2015). Vitamin E: a role in signal transduction. *Annual Review of Nutrition*, 35, 135-173.