

Estudio comparativo del consumo de aceite de oliva virgen o seje sobre el perfil lipídico y la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) del plasma de rata.

María Isabel Giacopini, Omaira Guerrero, Manuel Moya, Virgilio Bosch.

Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
Universidad Pedagógica Experimental Libertador, Caracas - Venezuela

RESUMEN. Nosotros comparamos los efectos del consumo de aceite de seje (*Oenocarpus bataua*), con respecto al de oliva virgen sobre la concentración de los lípidos del plasma y de la susceptibilidad de oxidación in vitro de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la rata Sprague Dawley. Dos grupos de 10 ratas macho, fueron alimentados ad libitum por un lapso de 8 semanas, con una dieta purificada que contenía 10g aceite de seje u oliva/100 g de dieta (GS y GO respectivamente). Se extrajo la sangre a los animales previo ayuno de 14 horas. El plasma fue aislado por centrifugación, y las fracciones de lipoproteínas se separaron por ajuste de densidad y ultracentrifugaciones sucesivas. Las HDL de ambos grupos fueron oxidadas por incubación con iones cobre. La diferencia de susceptibilidad de oxidación de las HDL fue estudiada midiendo la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a las 3 horas. Las ratas del GO presentaron una disminución estadísticamente significativa en la concentración de los triglicéridos TG ($p<0.05$) comparada con las ratas del GS. Las HDL del GS experimentaron una disminución estadísticamente significativa de la susceptibilidad de oxidación de las HDL respecto a las HDL GO. Esto puede ser atribuido a la más baja concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en las HDL GS comparado con las HDL del GO.

Palabras clave: *Oenocarpus bataua*, Oxidación de lipoproteínas, aceite de seje, aceite de oliva.

SUMMARY. Comparative study of the consumption of virgin olive oil or seje on lipid profile and oxidation resistance of high density lipoprotein (HDL) of rat plasma. We compared the effect of the consumption of seje oil (*Oenocarpus bataua*), with that of olive oil, on plasma lipids and susceptibility in vitro to oxidation of high density lipoprotein (HDL) in the rat. Two groups of ten male Sprague Dawley rats were fed ad libitum, for a lapse of eight week, with a purified diets with 10g de seje oil or olive oil/ 100 g of diet (GS y GO respectively). The animals were exsanguinated at the end of the experimental after a 14 hour fast. Plasma was isolated by centrifugation, and the fractions of lipoproteins were separated from the plasma by sequential ultracentrifugation. Rats of GO had a statistically significant lower in concentration of TG ($p<0.05$) compared with GS group. HDL fractions in both groups were oxidatively modified by incubation with copper ions. Differences in the fractions susceptibilities to peroxidation were studied by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) for 3 hours. HDL in GS had a statistically significant decrease in TBARS formation ($p<0.05$) relative to HDL of GO. This may be explained by the lower concentration of polyunsaturated fatty acids of HDL in GS compared with HDL in GO.

Key words: *Oenocarpus bataua* oxidation of lipoprotein, seje oil.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno, unido a una disminución de los mecanismos de defensa antioxidantes, conduce a un aumento en la concentración de radicales libres (RL), o estrés oxidativo, que constituye la base de la hipótesis oxidativa de la aterosclerosis (1). Estudios experimentales en modelos animales, epidemiológicos e investigaciones clínicas apoyan la hipótesis de que los cambios conformacionales de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) son causadas por la peroxidación lipídica, y que estas li-

poproteínas oxidadas (LDLox, HDLox) desempeña un papel causal e importante en la aterogénesis (2-4). La susceptibilidad de la LDL a la oxidación viene determinada por diversos factores endógenos y exógenos (5). Entre estos últimos, los factores nutricionales revisten especial importancia, como los tipos de ácidos grasos y compuestos antioxidantes de la dieta (6).

Estudios realizados en animales y en pacientes hipercolesterolémicos, señalan que el consumo de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y pobres en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), enriquecen la LDL con ácido oleico y resultan lipoproteínas más resistentes a la oxidación y producen menos die-

nos conjugados (DC), peróxidos de lípidos (PL), o malondialdehído (MDA), respecto a LDL ricas en AGPI. Esto se atribuye a que los AGPI poseen mayor número de dobles enlaces susceptibles al ataque de los (RL), iniciadores de la reacción en cadena de peroxidación lipídica (7-8)

Además, recientes investigaciones han determinado que el consumo de aceite de oliva rico en ácido oleico, AGMI, tiende a reducir el riesgo cardiovascular relacionado con la concentración plasmática de TG, LDL-C, la relación LDL-C: HDL-C, y la susceptibilidad de oxidación de las LDL. (9-11)

Estas observaciones reafirman la importancia de las grasas de la dieta para la prevención de ECV, donde ha de considerarse el aceite de oliva como un componente nutricional importante de la misma, por su alto contenido de AGMI y de compuestos con propiedades antioxidantes.

En este sentido, estudios realizados sobre las características químicas, físicas y perfil de ácidos grasos (AG) de diferentes tipos de aceites de consumo humano en Venezuela, detectaron que un aceite extraído por etnias venezolanas de la pulpa del fruto de una palma silvestre denominada *Oenocarpus bataua*, anteriormente denominada *Jessenia bataua* (12), y llamada comúnmente en Venezuela "seje", (13), presenta una alta concentración del ácido oleico (80 g/100), lo que lo asemeja al aceite de oliva (14)

A pesar, que el aceite de seje posee características físico-químicas y composición de AG similares al aceite de oliva, que permiten recomendarla para consumo humano, no se dispone de información científica sobre su efecto sobre factores de riesgo cardiovascular. Siendo el propósito de esta investigación, comparar el efecto del consumo del aceite de seje con respecto al aceite de oliva, sobre el perfil lipídico y la susceptibilidad de oxidación in vitro de la fracción HDL de plasma de rata, con la finalidad de definir su utilidad desde el punto de vista de aceite con actividad antioxidante

MATERIALES Y METODOS

Animales y dietas.

En este estudio se utilizaron un total de 20 ratas machos de la cepa Sprague Dawley, con un peso promedio de 200 ± 20 g de peso. Los animales fueron colocados en jaulas individuales, y separados en dos

grupos de 10 ratas/grupos (GS- GO) y alimentados ad libitum por un lapso de ocho semanas.

La composición de la dieta experimental se muestra en la Tabla 1. La dieta de cada uno de los grupos contiene 10g/100 de aceite, siendo las fuentes de ácidos grasos los siguientes aceites: Grupo Seje (GS): aceite crudo de seje extraído mediante un procedimiento artesanal, que data de épocas anteriores a la conquista europea (14); de La Esmeralda, Druida Marahuaca, y Grupo Oliva (GO): aceite de oliva virgen comercial (Caracas, Venezuela). El consumo de la dieta y peso de los animales fue controlado diariamente durante el periodo que duró el experimento.

TABLA N°1
Composición de la dieta experimental.(g/100g)

Componentes	Composición
Caseína	22.47
Almidón de maíz	57.53
Aceite (Seje u Oliva)	10.0
Bitartrato de colina	0.2
Mezcla de minerales (AIN)	3.5
Mezcla de vitaminas (AIN)	1.0
DL-metionina	0.3

Recomendaciones de American Institute of Nutrition (AIN)

Índices de calidad.

Para las determinaciones de acidez y peróxidos, se siguió la metodología descrita en los reglamentos: de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), a las muestras de los aceites se les determinó: acidez libre oleica (titulación volumétrica, COVENIN, 1996b) e índice de peróxidos (COVENIN, 1998) (15-16)

Determinación de la concentración de tocoferoles en los aceites.

La determinación de los tocoferoles en los aceites, se hizo por cromatografía líquida (HPLC), según el método de la AOCS, Ce 8-89 (17). El equipo empleado para la separación y cuantificación de los tocoferoles fue un cromatógrafo de líquidos con un detector de arreglo de diodos marca Perkin Elmer modelo 235C, y una columna marca Alltech fase normal silica, 250 mm x 4,6 mm x 5 micrones. La fase móvil que se empleó en la separación fue una mezcla de n-hexano-

isopropanol 99,75:0,25 (v/v) con un flujo de 1 ml/min, y un volumen de inyección de 20 µL. Se empleó una longitud de onda de 290 nm.

Análisis de ácidos grasos

Los AG se extraen de acuerdo al método de Folch et al. (18). La composición de AG fue determinada por cromatografía gas/ líquido después de la transesterificación de los AG con una mezcla metanol/tolueno /ácido sulfúrico en proporción 86:10:4 e incubados por 90 min., a 80°C. (19). El porcentaje de los metil ésteres de los ácidos grasos (MAG) fueron determinados después de su separación utilizando un cromatógrafo de gases HP, modelo 6890 Plus GC, versión A.03.07; con una columna capilar recubierta interiormente de una película de cyanopropil 0, 2 µm, con una longitud de 100 m y un diámetro interno de 0.25mm (HP-88).

Obtención del plasma.

Después de ocho semanas, los animales previo ayuno de 14 horas, fueron anestesiados con Neosdonal (Specia-París-Francia) por vía intraperitoneal (5mg/100 g de peso corporal) y se extrajo la sangre por punción cardíaca. La sangre fue colectada en tubos con 10 µl/mL de EDTA al 10%, y centrifugada a 2000 g por 15 min a 10°C. El plasma obtenido se conservó bajo refrigeración a 4°C, hasta su procesamiento.

Aislamiento de las lipoproteínas del plasma.

Las diferentes fracciones de lipoproteínas del plasma VLDL (d<1.019 gr/ml), LDL (d= 1.019 – 1.063 gr/ml) y HDL (d= 1.063 –1.021 gr/ml) fueron separadas por ajuste de densidad con bromuro de potasio (KBr) y ultracentrifugaciones sucesivas por 20 horas a 40.000 rpm (100000 g) y temperatura 15°C utilizando una ultracentrifuga marca Beckman, modelo L5 – 55, y un rotor Spinco 50 Ti, como se ha descrito anteriormente (20).

Determinación de las variables bioquímicas

Se realizaron las determinaciones de triglicéridos totales y colesterol total y en las fracciones VLDL, LDL, y HDL por métodos enzimáticos-colorimétricos INVELAB.

Determinación del grado de oxidación.

Se determinó el grado de oxidación del plasma y de las HDL previo a la oxidación (21). Las fracciones

de HDL (n=10/Grupo) aisladas son desalinizadas (7). La concentración de proteínas, se determinó de acuerdo al método de Lowry modificado por Shacterlec y Pollack (22). La oxidación de las HDL se indujo por la adición de CuSO₄ (7µM) según método de Thomas, C., y col (23). A las 3 horas, se determinó el grado de oxidación de las HDL in vitro por el método propuesto por Kosugi, H y col (24). Los resultados son expresados como nmoles de SRTBA/mg de proteína.

Determinación del Índice de Peroxidabilidad (IP)

A partir de la composición de AG se calculó Índice de Peroxidabilidad (IP), el cual refleja la susceptibilidad de peroxidación considerando el potencial de oxidación de cada AG. (25)

$IP = (\% \text{ AGMI} * 0.025) + (\% \text{ ácido dienoico} * 1) + (\% \text{ de AG trienoico} * 2) + (\% \text{ AG tetraenoico} * 4) + (\% \text{ AG pentaenoico} * 6) + (\% \text{ AG hexaenoico} * 8)$

Análisis estadístico.

Los resultados son presentados como promedios ± desviación estándar (D.E.). Se utilizaron para el análisis estadístico de las variables estudiadas, la prueba ANOVA de un factor, y la comparación de las medias por la prueba de Turkey, considerándose significativo un valor de "p" inferior a 0,05.

RESULTADOS.

El peso promedio de las ratas alimentadas con las dietas que contenían 10 g/100 de aceite de seje u oliva, después de las ocho semanas, fue 409±16 y 427± 12 g respectivamente, no se observó diferencia significativa en el crecimiento de las ratas entre los grupos.

Los valores de acidez en las muestras correspondientes al aceite de seje y oliva estuvieron por debajo del 2%, que es el máximo establecido por la Norma para los aceites vírgenes de oliva. En cuanto al Índice de Peróxidos, los resultados mostraron valores inferiores al límite máximo permitido por la norma COVENIN para aceite oliva virgen (<20 meq O₂ Kg-1) (Tabla2). De los cuatro isómeros del tocoferol solo se detectó el α- tocoferol, siendo la concentración en el aceite de oliva el doble de la del aceite de seje, 22 ppm y 11ppm respectivamente (Tabla 2).

El perfil de AG de los dos aceites indica que ambos presentan la misma concentración de ácido oleico, AGMI, diferenciándose en el porcentaje de los

TABLA 2
Características químicas de los aceites de seje y oliva virgen

Característica	Aceite de Seje	Aceite de Oliva (V)
Índice de Acidez (% Ac. Oléico)	0,70 ± 0,03	0,46 ± 0,03
Índice Peróxido (meq/Kg)	4.5±0.02	12.0 ±0.08
α- tocoferol (ppm)	11.0	22.0

Acidez aceite de oliva virgen 1 a 2% Ac. Oleico

Índice Peróxido de aceite de oliva virgen <20

AGPI linoleico y linolénico. El aceite de seje presenta una relación de W6/W3 de 6.04±0.33 a 13.06±0.38 en el aceite de oliva, proporción que se mantiene en la dieta y en la fracción de HDL (Tabla 3). Un hecho notorio es que la concentración de ácido araquidónico es menor en las HDL del GS respecto al GO y por lo tanto el IP de las HDL del GS es menor que el de las HDL GO (Tabla 3).

Los lípidos al final del estudio se muestran en la Tabla 4. Se observó, una diferencia estadísticamente

significativa entre la concentración de TG del GO respecto al GS ($p < 0.05$). No se detectaron sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRTBA), en el plasma y en las fracciones de HDL de las ratas post periodo experimental (resultados no mostrados). En la Tabla 5 se observa la marcada diferencia entre los valores promedios ± DE ($p < 0.05$), de la concentración de los productos de oxidación de las HDL de los GS y GO a las 3 horas de inducida la reacción con CuSO₄.

DISCUSIÓN

El aceite de seje presentó un valor de índice de acidez y de peróxidos inferiores a los valores permitidos por la Norma para el aceite de oliva virgen, así como un Índice de Peroxidabilidad menor lo que indica una mayor estabilidad frente a la oxidación que el aceite de oliva.

La diferencia de concentración del ácido araquidónico (C20:4 n-6) y docosahexanoico (C22-6 n-3) de las HDL de ambos grupos, obedece a la diferencia de concentración en las dietas de los precursores de estos AG, el ácido linoleico (C18:2, n-6) y el α- linolénico

TABLA N° 3
Composición de los ácidos grasos de los aceites- dietas y HDL de las Ratas. (g/100g)

AG	Aceites		Dietas		HDL	
	Seje	Oliva	Seje	Oliva	GS	GO
16:00	8.43±0.09*	11.38±0.04	11.81±0.15	11.98±0.3	26.88±0.40	26.65±0.16
18:00	3.13±0.01	3.54±0.06	3.06±0.03	3.75±0.04	11.25±0.21	11.28±0.09
18: 1 Cis	81.18±0.06	81.01±0.01	75.06±1.41	74.07±0.02	35.23±0.46	34.90±0.21
18: 2 n-6	2.85±0.18*	8.29±0.02	3.69±0.09*	7.52±0.10	3.38±0.08*	7.60±0.04
18: 3n-6	1.42±0.15*	0.46±0.01	0.13±0.01*	0.44±0.02	0.50±0.10	0.61±0.01
18:3 n-3	0.67±0.04	0.74±0.01	0.71±0.00	0.71±0.01	0.14±0.00	0.14±0.00
20:4 n-6	-----	-----	-----	-----	2.86±0.04*	6.72±0.04
20:5 n-3	-----	-----	-----	-----	-----	0.12 ±0.02
22: 6 n-3	-----	-----	-----	-----	0.46±0.00	0.42±0.01
∑AGS	11.56±0.01	14.89±0.01	16.81±0.08	15.73±0.02	45.40±0.7*	41.28±0.26
∑AGMI	81.18±0.06	81.01±0.01	75.06±1.41	73.07±0.01	35.20±1.7	34.90±0.21
∑AGPI	4.94±0.01*	10.41±0.08	4.52±0.08*	8.66±0.13	7.34±0.1*	14.94±0.08
W6/W3	6.04±0.33*	13.06±0.38	5.19±0.08*	11.28±0.06	13.56±0.73*	25.91± 0.48
IP	9.10±0.60*	13.65±0.06	7.23±0.04*	11.67±0.16	22.65±0.20*	39.07±0.16

Los valores de AG de los aceites y de las dietas representan la media ± DE (n= 3)

Los valores de las HDL representan la media ± DE de tres mezclas de (n= 9)

* Indica que existe diferencia significativa $p < 0.05$

IP es el Índice de Peroxidabilidad calculado a partir de la composición de AG.

TABLA 4
Concentración de lípidos en el plasma de las ratas (mg /dL)

Grupo	C total	Triglicéridos	VLD-C	LDL-C	HDL-C
Seje	53.8 ± 9.5	51.2 ± 11.9*	3.6 ± 0.5*	3.3 ± 1.0	25.5 ± 6.5
Oliva	54.0 ± 13.3	39.6 ± 9.6	2.6 ± 2.7	3.4 ± 2.4	22.2 ± 5.1

Los valores representan el promedio ± DE (n = 10 por grupo)

(*) Indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, establecidos mediante la prueba ANOVA siendo significativo a $p < 0,05$.

TABLA 5
Grado de oxidación de la fracción HDL de plasma de rata con dieta al 10% aceite seje u oliva a las 3horas (nmoles TBARS/ mg de proteína)

GRUPO	Seje	Oliva
Grado de Oxidación (3horas)	4 ± 0.94*	14 ± 5.92

Los valores representan el promedio ± DE (n = 10 por grupo)

* Indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, establecidos mediante la prueba ANOVA, siendo significativo a $p < 0,05$.

(18:3, n-3) respectivamente. Este resultado concuerda con evidencias de que la síntesis de estos AG está influenciada por la cantidad y la relación de (C18:2, n-6) / (C18:3, n-3) en la dieta (26).

La disminución de la concentración de los TG por el consumo de aceite de oliva virgen es consistente con estudios previos. Se ha demostrado que el aceite de oliva contribuye a modular los procesos metabólicos relativos a la secreción y al transporte de triglicéridos. (27) Además, existen evidencias de que el aceite de oliva genera lipoproteínas intestinales ricas en triglicéridos que se metabolizan con rapidez (28)

La ausencia de TBARS en el plasma y las fracciones de HDL de ambos grupos después del periodo experimental, nos permite concluir que hay un balance oxidativo/ antioxidativo en plasma y HDL antes de inducir la reacción de oxidación. Un hallazgo muy notorio e importante de este trabajo es en la menor susceptibilidad a la oxidación in vitro de las HDL del GS, en comparación a las HDL GO ($p < 0,05$). Todo esto muy de acuerdo con las diferencias que existen en cuanto al contenido de AGPI e IP de las dietas utilizadas y las HDL (7-9).

Estos resultados indican que el aceite de seje, a pesar de poseer una concentración de ácido oleico

igual al aceite de oliva, presenta una menor relación w6/w3 lo cual conduce a lipoproteínas con una concentración menor de linoleico y araquidónico. Esto nos hace pensar que el consumo de aceite de seje puede producir metabolitos con menos actividad inflamatoria que el aceite de oliva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero recibido del CDCH (P.I 09-5621-2007). Así como la colaboración de la Dra. Julia Flores por la orientación prestada en la realización del mismo. Al Especialista de Servicios Analíticos Alexis Reyes del Laboratorio de Servicios Analíticos de Alimentos Polar por la determinación de tocoferoles en los aceites utilizados en la dieta.

REFERENCIAS

1. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Barter PJ The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids. The regulation and remodeling of HDL by plasma factors. *Atherosclerosis* 2002; 3:39-47.
2. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11:93-102.
3. Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993; 98: 1-9.
4. Streinbrecher UP, Zhang H, Loughheed M. Role of oxidative modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biology y Medicine* 1990; 9: 155 – 168.
5. Diplock AT. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am. J. Clin Nutr.* 1991; 53: 189 S - 193 S.
6. Esterbauer H, Jürgens G, Quehemberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein : loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J lipid Res.* 1987; 28: 495 –509.
7. Giacopini MI, Bosch V. Oxidación de las lipoproteínas de alta y baja densidad del plasma humano y su correlación con la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2002; 25: 10-12
8. Giacopini MI, V. Bosch; Efecto del consumo de dietas con aceite de palma- girasol o pescado sobre la oxidación de las lipoproteínas LDL-HDL del plasma de rata. *Anales Venezolanos de Nutrición* 2008; 21: 20-24.
9. Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sor-

- gato F, Dorella M, Maiorino M and Ursini F. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 1992;12: 529-533
10. Lòpez J , Baderion L, Bonanome A, Lairon D, Kris-Etherton P, Mata P, Perèz-Jimenez F. Monounsaturated fat and cardiovascular risk. *Nut Rev.* 2008; 64: S2-S12
 11. Ruiz-Gutierrez V, Morgado N, Prada JL, Pérez-Jiménez F y Muriana FJ: Composition of human VLDL triacylglycerols after ingestion of olive oil and high oleic sunflower oil. *J Nutr.* 1998; 128:570-576
 12. Montúfar R, Pintaud J. Estatus taxonómico de *Oenocarpus bataua* (Euterpeae, Arecaceae) inferido por secuencias del ADN cloroplástico. *Rev. Perú. Biol.* 2008; 15(supl. 1): 073- 078
 13. Hoyos JF. Palmas de Venezuela. Caracas: Soc.de Ciencias Naturales La Salle; 1989.
 14. Navas P, Briceño J. Comparación de las características químicas, físicas y perfil de ácidos grasos de los aceites de seje, oliva, maíz y soja. *Rev. Fac. Agron.* 2005; 31:109 -
 15. COVENIN. 1996b. Aceites y grasas vegetales, Norma No 325: Determinación de la acidez. Comisión Venezolana de Normas Industriales, Caracas.
 16. COVENIN. 1998. Aceites y grasas vegetales, Norma No 508: Determinación del índice de peróxidos. Comisión Venezolana de Normas Industriales, Caracas.
 17. American Oil Chemists' Society. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC. Uniform Methods Committee. AOCS Official Method Ce 8-89. AOCS, 1993Champaign, IL.
 18. Folch, J, Lees, M. Y Sloane, G.H; A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol: Chem.* 1957; 228: 497 --509
 19. Lepage G, Roy C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction *Journal of Lipid Research*, 1986; 27: 114-120.
 20. Havel, R., Eder, H.A., y Bragdon, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955; 4: 1345 –1353.
 21. Feldman E. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Assay. Animal Models of Diabetic Complications Consortium (AMDCC) Protocols. Disponible en <http://www.amdcc.org/shared/showFile.aspx?doctypeid=3&docid=33>
 22. Schacterle G Y Pollack R. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.* 1973; 51: 654 – 6655.
 23. Thomas, C.E., y Jackson, R.L. Lipid hhydroperoxide involvement in copper – dependent and independent oxidation of low density lipoproteins. *J. Pharmacol – Exp. – Ther.* 1991; 256: 11182 – 1188.
 24. Kosugi, H., Kojima, T., y Kikugawa, K. Characteristics of the Thiobarbituric acids reactivity of oxidized fats and oils. *JAOCS.* 1991; 68:51 –55.
 25. Witting L A , Horwitt MK. Effects of degree of fatty acids unsaturation in tocopherol deficiency –induced Creatinuria .*J of nutrition.* 1964; 82:20-33
 26. Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. Estudio. FAO Alimentación y Nutrición – ROMA 1997
 27. Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M., Beisigel, U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J. Mol. Med.* 2002; 80:576-584.
 28. Pacheco Y, Bermúdez B, López S, Abia R, Muriana F. Blood transport and genomic effects of olive oil components. *Grasas y Aceites* .2004; Vol. 55. 11-23

Recibido: 17-06-2010

Aceptado: 02-06-2011