



Revista Chilena de Nutrición

ISSN: 0716-1549

sochinut@tie.cl

Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y
Toxicología
Chile

Londoño L., Julián; Montoya P., Guillermo; Guerrero M., Karina; Aristizabal, Leidy; Arango A., Gabriel
J.

LOS JUGOS DE CÍTRICOS INHIBEN LA OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD:
RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES Y MOVILIDAD
ELECTROFORÉTICA

Revista Chilena de Nutrición, vol. 33, núm. 3, diciembre, 2006

Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología

Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46914636011>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

LOS JUGOS DE CÍTRICOS INHIBEN LA OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD: RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES Y MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

CITRUS JUICE INHIBITS LOW DENSITY LIPOPROTEIN OXIDATION: RELATIONSHIP BETWEEN FREE RADICAL SCAVENGER ACTIVITY AND ELECTROPHORETIC MOBILITY

Julián Londoño L. (1), Guillermo Montoya P. (1), Karina Guerrero M. (1), Leidy Aristizabal (1), Gabriel J. Arango A. (2)

(1) Sede de Investigación Universitaria, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Medellín, Colombia.

ABSTRACT

Epidemiological studies have shown that consumption of fruits and vegetables are associated with beneficial effects on human health including the reduction of coronary artery disease (CAD) risk. Fruits and their juices contain phytochemicals that inhibit in vitro the low-density lipoprotein (LDL) oxidation, a key process involved in the generation of arterial lesions. We developed an study to examine the phenolics compound content of citrus juice cultivated in the southwest of Antioquia, Colombia, its free radical scavenger activity and in vitro effect on LDL oxidation. Five citrus varieties were analyzed: *Citrus sinensis* valencia, *Citrus reticulata* clementina, *Citrus reticulata* oneco, Tangelo Orlando and Tangelo mineola. The results showed that no correlation exists between phenolic compounds content and free radical scavenger activity in the citrus juices analyzed. However a high inhibitory capacity of LDL oxidation was found.

Key words: Cítricos; phenolic compounds content; free radical scavenger activity; inhibition of LDL oxidation.

RESUMEN

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de frutas y vegetales se asocia con efectos beneficiosos sobre la salud humana, incluyendo reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV). Las frutas y sus jugos contienen compuestos que inhiben la oxidación de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL), un proceso clave en el desarrollo de la lesión arterial. Se ha desarrollado un estudio para determinar el contenido de compuestos fenólicos, la actividad captadora de radicales libres y el efecto sobre la oxidación de LDL, de jugos de cítricos cultivados en el suroeste de Antioquia (Colombia). Cinco variedades de cítricos fueron analizadas: *Citrus sinensis valencia*, *Citrus reticulata clementina*, *Citrus reticulata oneco*,

Tangelo orlando, Tangelo mineola. Se demostró que en estos jugos no existe correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad captadora de radicales libres (ACRL), sin embargo, se encontró una alta capacidad para inhibir la oxidación de LDL.

Palabras claves: cítricos; actividad captadora de radicales libres; contenido de compuestos fenólicos; inhibición de la oxidación de LDL.

INTRODUCCIÓN

Del punto de vista nutricional los cítricos son una buena fuente de vitamina C, un vaso de jugo de naranja es suficiente para cubrir la ingesta diaria de esta vitamina, fijada en la Tabla de Alimentos y Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos en 75 mg/día para mujeres y 90 mg/día para hombres (1,2).

Otros metabolitos con actividad biológica presentes en el género Citrus son los compuestos fenólicos, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza abarcando aproximadamente 8.000 sustancias, divididas en 22 grupos con una estructura común determinada por un anillo aromático unido al menos a un sustituyente hidroxilo (grupo fenol) (3). Un grupo importante de compuestos fenólicos corresponde a los flavonoides, abundantes en los cítricos, entre ellos naringina, hesperidina, rutina y diosmina, los cuales están presentes en toronja, naranja, limón y mandarina, respectivamente. (4-7).

Muchos compuestos fenólicos actúan como antioxidantes primarios donando un átomo de hidrógeno rápidamente a un radical lipídico, formando un nuevo radical (fenoxil) más estable que el primero, deteniendo así la fase de propagación de la oxidación (8); sin embargo esta capacidad estabilizadora de radicales libres esta determinada, no solo por la presencia de la función fenólica, si no por una serie de hechos estructurales que favorecen el proceso, entre ellos la presencia de grupos voluminosos donadores de electrones unidos a un anillo resonante, lo que confiere mayor capacidad de estabilización del radical fenoxil y disminución de la energía del enlace O - H (9,10).

El desbalance entre agentes oxidantes y antioxidantes se ha implicado en la etiología de algunas patologías como la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares asociadas (isquemia, infarto agudo a miocardio, accidente cerebrovascular), las cuales ocupan el primer lugar entre las causas de mortalidad en el mundo, por encima de las enfermedades infecciosas, VIH/SIDA, neoplasias y diabetes (11).

Este enlace entre estrés oxidativo y aterosclerosis se generó de la evidencia soportada en la «hipótesis de modificación oxidativa de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL)», según la cual la aterosclerosis es iniciada y promovida por la oxidación de LDL, conduciendo a la modificación de la Apolipoproteína B, lo que conlleva a que la partícula de LDL sea reconocida por receptores «scavenger» del macrófago, produciendo células espumosas cargadas de colesterol, origen de la placa ateromatosa. Estas modificaciones oxidativas en la ApoB, encontradas en lesiones in vivo y generadas in vitro, pueden ser evidenciadas mediante cambios fisicoquímicos e inmunológicos, tales como un aumento en la electronegatividad y mayor reactividad frente a anticuerpos monoclonales (Anti LDLox). (12-15).

El objetivo del presente estudio es evidenciar en jugos de cítricos, la relación existente entre el contenido de compuestos fenólicos, la actividad captadora de radicales libres y la capacidad para proteger la LDL del daño oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODO

Reactivos

El DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Sudan Black B, Agarosa Tipo II, Buffer barbital sódico, Ácido gálico, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co, Daflón® lote 4H2319 fue adquirido de EuroEtika, Kit Rápido para cuantificación de proteínas se obtuvo de Fluka y agua ultrapura (19y) fue suministrada por un sistema Milli-Q Water system, Millipore Inc.

Material vegetal

Naranja (*Citrus sinensis*) de la variedad valencia., Mandarina (*Citrus reticulata*) de las variedades oneco y clementina e híbridos Tangelo orlando y Tangelo mineola, categoría extra (16), fueron recolectadas de una extensión de 250 Ha cultivadas, comprendidas entre los 700 - 1300 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), con una pluviosidad promedio de 2200 mm³/año, luminosidad de 1900 horas y humedad relativa de 75-76%, ubicada en la Hacienda La Cristalina del municipio de Támesis (Antioquia).

Un Muestreo Aleatorio Estratificado Simple (MAES) fue aplicado a los embalajes que contenían frutos categoría extra y fueron obtenidas 10 unidades muestrales de cada variedad, lo cual constituye la muestra piloto (17).

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Obtención del jugo

Los 10 frutos de cada variedad fueron procesados individualmente bajo un Procedimiento Operativo Estándar. El jugo fue obtenido del endocarpio en un mezclador de alimentos convencional (Philips mix), fue filtrado a través de gasa estéril y papel de filtro Watman N° 501 y almacenado a 4°C en frascos vidrio ámbar con atmósfera de N₂ para prevenir cambios oxidativos. Al momento del ensayo una alícuota de 1,0 ml de jugo fue centrifugada a 9 000 rpm durante 10 minutos. El mismo procedimiento fue aplicado a 0,5 ml de jugo y 0,5 ml de DMSO, con el fin de evaluar en el ensayo de oxidación de LDL la extracción diferencial de compuestos activos por este solvente.

Diluciones 1/25 (para el análisis de ACRL) y 1/10 (para contenido de compuestos fenólicos) fueron preparadas como soluciones de trabajo.

Actividad captadora de radicales libres (ACRL)

Las determinaciones de la ACRL se realizaron según el método aplicado por Williams y colaboradores (18). Las diluciones de los jugos (1/25) fueron mezcladas en proporción 1:2 (v/v) con una solución metanólica de DPPH (5.07x10⁻⁵M). La absorbancia a 517 nm fue determinada exactamente cinco minutos después de iniciada la reacción y la decoloración fue comparada con una solución que contenía la misma proporción 1:2 (v/v) de agua desionizada

y DPPH. Una solución de jugo y agua desionizada en la misma proporción 1:2 (v/v) sirvió como blanco de la muestra para corregir su color.

Se realizaron cuatro mediciones de cada uno de los jugos y se aseguró que la variabilidad entre ellas no superará el 10%. Los resultados fueron expresados como porcentaje de decoloración de DPPH utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{Decoloración DPPH} = \left(1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_{\text{DPPH}}} \right) * 100$$

Donde A_m es la absorbancia de la mezcla de reacción (DPPH + jugo), A_{bm} la del blanco de muestra (jugo + agua) y A_{DPPH} la absorbancia de la solución de DPPH.

Adicionalmente la actividad captadora de radicales libres del jugo con mayor actividad fue comparado con una solución de 1,0 mg/ml de una mezcla micronizada de bioflavonoides cítricos que contiene 90% de diosmina y 10% de hesperidina (forma comercial Daflón® 500 mg), la cual es utilizada como potente fármaco flebotónico para el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica (19).

Contenido de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se determinaron con algunas modificaciones al método propuesto por Folin-Ciocalteu y descrito recientemente por Singleton (20). 750 μL de agua ultrapura fueron mezclados con 100 μL de muestra, 100 μL de una solución de carbonato de sodio 20% y 50 μL del reactivo de Folin Ciocalteu 2N, llevando a agitador mecánico luego de cada adición. La mezcla fue protegida de la luz durante 60 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se registró la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys2.

Los resultados fueron expresados como Equivalentes de Ácido Gálico (GAE) (mg equivalentes de ácido gálico por cada ml de jugo), para lo cual se preparó una curva de calibración con ácido gálico (10-100 $\mu\text{g/ml}$).

Inhibición de la oxidación de LDL

Aislamiento de LDL: La fracción de LDL se aisló por ultracentrifugación, aplicando gradiente discontinuo de densidad en un equipo Beckman XL-100, rotor SW-55Ti y tubos ultraclear 5 ml (21,22).

50 ml de plasma se obtuvieron de voluntarios sanos, no fumadores (20-25 años), por centrifugación a 2500 rpm y 4°C con citrato de sodio como anticoagulante (10,6 μmol citrato de sodio/ml de sangre). La fracción Quilomicrones-VLDL se obtuvo adicionando 1,6 ml de NaCl (1006 g/ml) sobre 3,2 ml de plasma y centrifugando a 49500 rpm a 5 °C por un periodo de 12 horas con desaceleración lenta. Se retiró la fracción superior (1,6 ml), se adicionó 1,6 ml de KBr (1,18g/ml) y se centrifugó nuevamente durante un periodo de 18 horas. SDS-PAGE fue usada para confirmar la pureza de las fracciones colectadas (Quilomicrones, VLDL, LDL, y HDL). La fracción proteica de LDL fue cuantificada por el ensayo estándar para espectrofotometría del Protein Quantification Kit-Rapid de Fluka, ajustando a 350 $\mu\text{g/ml}$. 80 μL de esta solución fueron preincubados con 10 μL de jugo durante 15 minutos, la oxidación

se inició con la adición de 10 μL de una solución CuSO_4 (100 μM) y calentamiento a 37°C durante 15 horas. La oxidación fue detenida por la adición de 5 μL de una solución 1% de EDTA y enfriamiento en un baño de hielo por 15 minutos.

El daño de la fracción proteica (Apo B 100) fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa (0,8%) en buffer barbital 0.05 M, pH 8,6, 100 V por 2 horas y revelado con sudan black B. Las distancias relativas fueron medidas utilizando el programa analizador de imágenes ImageJ V. 1.34S del National Institutes of Health - NIH. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la movilidad electroforética.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism® Versión 4.00 para Windows, (GraphPad software, Inc, San Diego CA 2003). Se realizó una ANOVA, aplicando el test de comparaciones múltiples de Newman Keuls, valores $p > 0,05$ fueron considerados no significantes (n.s), valores $p < 0,05$ significantes (*), valores $p < 0,01$ altamente significantes (**), y valores $p < 0,001$ fuertemente significantes (***). Un análisis de correlación de variables fue efectuado y se calcularon los coeficientes de pearson (r_p) y de determinación (r^2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

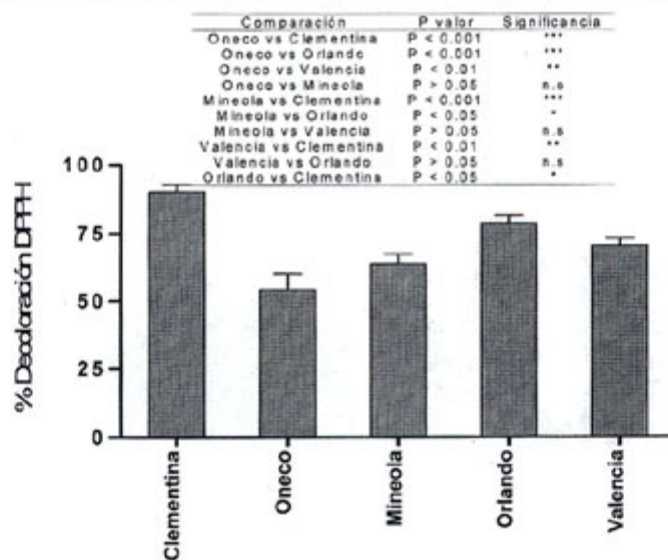
Actividad captadora de radicales libres

La ACRL varió ampliamente en los jugos analizados (% decoloración DPPH entre 26,35 - 96,75%), se observaron diferencias significativas entre algunas variedades y dentro de ellas. En la figura 1 se muestran los resultados de la ACRL, específicamente se observan diferencias entre variedades de la misma especie, como en el caso de mandarina oneco y mandarina clementina (*** $p < 0,001$) y entre tangelo mineola y tangelo orlando (* $p < 0,05$). Las diferencias dentro de las variedades están representadas por el error estándar (EE), una medida de dispersión correspondiente a las mediciones de las 10 unidades muestrales de cada variedad, en general las diferencias intra-variedad fueron amplias en el caso de la mandarina oneco (EE= 5.788) y disminuyeron para la mandarina clementina (EE= 2.485).

La mandarina clementina presentó el mayor efecto estabilizador de radicales libres, y por lo tanto se realizó una comparación cinética con el Daflón® 500 mg. La modelación cinética presentó una mejor descripción a partir de una ecuación de velocidad de primer orden. La constante de velocidad de reacción (K) (mmol DPPH estabilizado/segundo) fue calculada y se observa en la figura 2 que una dilución 1/25 (v/v) del jugo de mandarina clementina es alrededor de 55 veces más rápido que el Daflón® para estabilizar radicales libres. ($K_{\text{Daflon}} = 0,001427 \pm 2,312 \times 10^{-5}$, $K_{\text{clementina}} = 0,07934 \pm 3,165 \times 10^{-3}$).

FIGURA 1

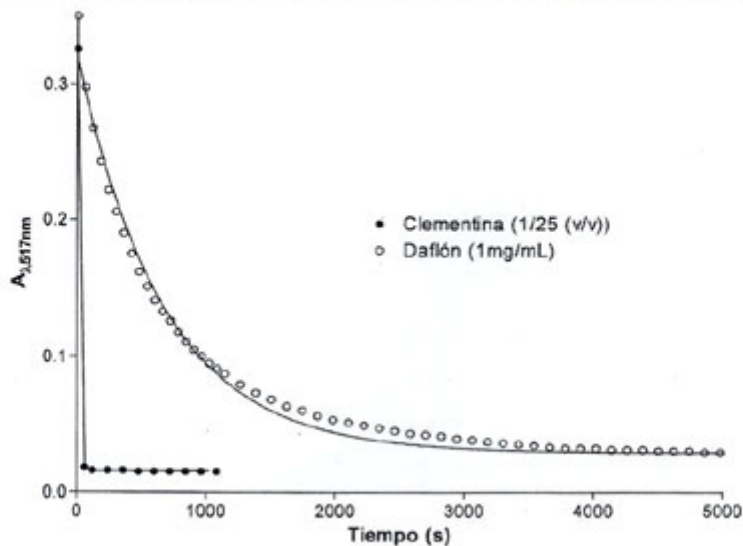
Actividad Captadora de Radicales Libres de jugos de cítricos.



500 μ L de muestra fueron adicionados a 1.0 ml de solución metanólica de DPPH, el porcentaje de decoloración del radical libre es directamente proporcional a la actividad antiradicalaria de la muestra. Los resultados se muestran como media \pm Error Estándar (EE) (n=10)

FIGURA 2

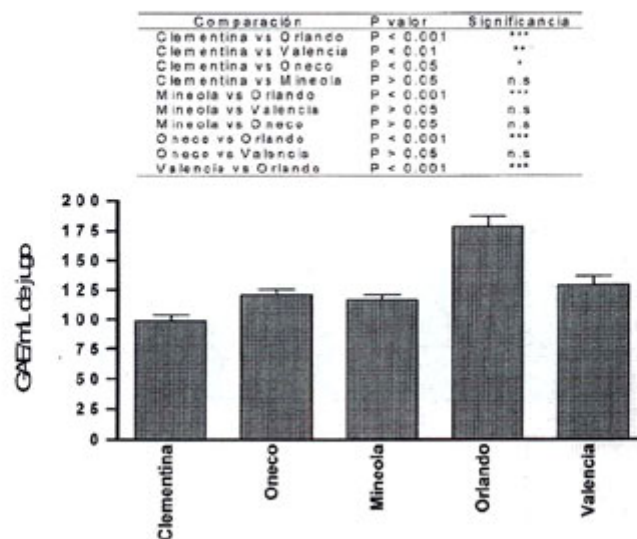
Estudio cinético de la estabilización del radical libre DPPH, comparación entre la velocidad de reacción del jugo de mandarina clementina (1/25) y Daflón® (1mg/mL).



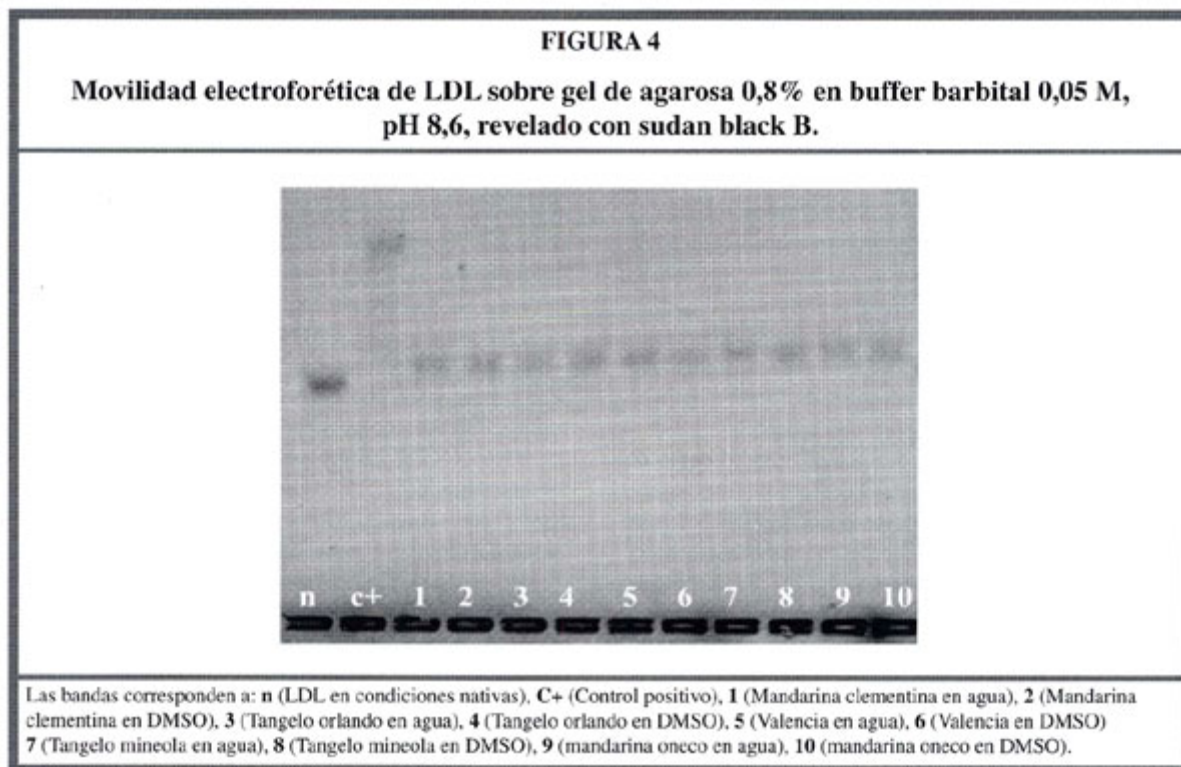
$K_{Daflon} = 0,001427 \pm 2,312 \times 10^{-3}$, $K_{clementina} = 0,07934 \pm 3,165 \times 10^{-3}$.

FIGURA 3

Determinación del contenido de compuestos fenólicos en jugos de cítricos utilizando el método Folin-Ciocalteu,



Los resultados son expresados como mg equivalentes de ácido gálico - EAG por ml de jugo y se muestran como media ± Error Estándar (EE) (n=10)



Contenido de compuestos fenólicos

En la figura 3 se muestra que de las variedades analizadas, Tangelo orlando presenta el mayor contenido de compuestos fenólicos (178,4 GAE/mL) y que por su parte la mandarina clementina tiene el menor contenido (98,77 GSE/mL); lo cual indica que no necesariamente un mayor contenido de compuestos fenólicos determinará una alta ACRL. Efectivamente la correlación de variables entre ACRL y contenido de compuestos fenólicos demostró que no existe una correlación significativa entre ellas ($r_p=0,2420$, $r^2=0,05856$, $p = 0,1180$)

Inhibición de la oxidación de LDL

El estudio demostró que los jugos de cítricos inhiben in vitro el daño oxidativo causado a la ApoB por productos de la descomposición oxidativa de lípidos, tales como malondialdehído, 4-hidroxinonenal y residuos de fosfolípidos oxidados que contienen terminaciones aldehídicas, los cuales pueden reaccionar con los grupos e-amino residuos de lisina de la ApoB, formando bases de Schiff e incrementando la carga negativa de la LDL (23) (Figura 4).

Se observó que no existen diferencias en la actividad inhibitoria de la oxidación de LDL en muestras preparadas en agua o DMSO, lo que implica que la extracción de compuestos activos en los jugos analizados no requiere de la utilización de otros solventes de mayor polaridad diferentes al medio acuoso.

La correlación entre contenido de compuestos fenólicos, ACRL y capacidad para inhibir la oxidación de LDL en los jugos de cítricos evaluados, demuestra que un mayor contenido de compuestos fenólicos no está necesariamente relacionado con un aumento en la actividad inhibitoria de la oxidación de LDL ($r_p= 0,08821$, $r^2= 0,007781$) y por el contrario la ACRL

muestra una relación directa con respecto a la inhibición de oxidación de LDL ($r_p = 0,9899$, $r^2 = 0,9799$), siendo el jugo de mandarina clementina el mas activo para estabilizar radicales libres e inhibir oxidación de LDL (Tabla 1).

CONCLUSIONES

Es obvio que el contenido de compuestos fenólicos determinado por el método de Folin - Ciocalteu no entrega un criterio completo acerca de la calidad e identidad de los constituyentes fenólicos de una muestra (20).

Como se observó claramente en este estudio la actividad antioxidante, medida como la capacidad para inhibir la oxidación de LDL, no se encuentra necesariamente correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos, lo que obliga a reevaluar la utilización de este último como parámetro predictivo de actividad antioxidante en futuros estudios.

Con base en este trabajo, se muestra que el jugo de mandarina clementina es una potencial fuente de compuestos con actividad antioxidante, sin embargo es importante centrar la atención en estudios posteriores que permitan conocer más acerca del contenido de metabolitos y su potencial actividad antiaterogénica, puesto que dadas las apreciadas características (cítricos de buen sabor, fácil pelado y ausencia de semillas), este tipo de frutas son valoradas en el mercado internacional y pese a su mayor precio, cuentan con mayores posibilidades de desarrollo, de hecho registra los precios promedio más altos en el mercado norteamericano ubicándose en 2,02 US\$/Kg entre 1997 y el 2001 (24).

TABLA 1			
Actividad Captadora de Radicales Libres, Contenido de Compuestos Fenólicos e Inhibición de la Oxidación de LDL de jugos de cítricos (Media ± Error Estándar).			
Variedad	DPPH (% Decoloración)	Compuestos fenólicos (GAE/mL)	LDL (% Inhibición Movilidad Electroforética)
Clementina	90,07 ± 2,48	98,77 ± 4,82	83,30 ± 0,03
Oneco	54,24 ± 5,79	121,0 ± 4,53	81,26 ± 0,01
Mineola	63,77 ± 3,60	116,2 ± 4,85	79,75 ± 0,69
Orlando	78,81 ± 2,66	178,4 ± 8,85	77,15 ± 0,18
Valencia	70,39 ± 2,86	128,7 ± 8,10	75,70 ± 0,03

Actualmente se han adelantado estudios que confirman el efecto antioxidante de estos jugos en sistemas ex vivo, caracterizan completamente los metabolitos presentes y comprueban el efecto antiaterogénico sobre modelos animales o incluso en humanos, como ya han mostrado algunos estudios nutricionales adelantados con otras frutas (25).

Se requieren estudios adicionales para evaluar el efecto de las amplias variaciones inter e intravarietal y establecer si son debidas a condiciones agroecológicas de cultivo y recolección no controladas en este estudio o si por el contrario se deben a la heterogeneidad

misma de los cultivos, lo cual permitiría la selección de especímenes con mayor producción de antioxidantes, influyendo directamente sobre la calidad nutricional de las frutas y sus derivados.

Agradecimientos: Este estudio fue financiado por la Universidad de Antioquia, a través del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) y hace parte de los resultados del proyecto CPT - 0327.

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuarias (CORPOICA), regional Antioquia, por la asesoría en el proceso de muestreo y a Agrícola Unidas S.A. por el suministro de las frutas. Así mismo agradecen al Dr. Luis Fernando Barrera por su asesoría (Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Universidad de Antioquia) y al Dr. Carlos Codina (Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España), por sus acertados aportes en la redacción de este artículo.

Bibliografía

1. Monson, E.R. Dietary References for the antioxidant nutrients. *J Am Diet Assoc* 2000;100:637-639
2. National Academy of Sciences, Institute of Medicine. Food and Nutrition Board: Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academies Press. Washington D.C. 2000.
3. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganda, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 1997;2:152-159.
4. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Masamichi Ykoizumi M, et al. Quantitative study of flavonoids of citrus plants. *J Agric Food Chem* 2000; 48:3865-3871.
5. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. HL-60 Differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from citrus juices. *J Agric Food Chem* 1999a;47:128-135.
6. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem* 1999b;47:3565-71.
7. Del Río J. A., Fuster M. D., Gómez P., Porras I., García-Lidón A., Ortuño A.. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry* 2004;84: 457-461
8. Salah, Nicholas J. Miller. George Paganga, Lilian Tijburg. Polyphenols flavonoids as scavengers of aqueous phase radicals and as chain - breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics* 1995;322 (2): 339-346.

9. Lien Eric J., Shijun Ren, Huynh-Hoa Bui, Rubin Wang. Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Of Phenolic Antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 26 3/4: 285-294.
10. Noguchi Noriko, Etsuo Niki. Phenolic Antioxidants: A Rationale For Design And Evaluation Of Novel Antioxidant Drug For Atherosclerosis. *Free Radical Biol Medicine* 2000;28(10):1538-1546.
11. World Health Organization (WHO). The World Health Report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life National, Chapter four: Quantifying Selected Major Risks to Health. Génova, 2002.
12. Hamilton C.A. Low-Density Lipoprotein and Oxidised Low-Density Lipoprotein: Their Role in the Development of Atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 1997; 74(1): 55-72
13. Hessler J. R., Robertson A. L. Jr., Chisolm G. M. LDL induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis* 1979; 32:213-229.
14. Hessler J. R., Morel D. W., Lewis L. J., Chisolm G. M. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 1983;3:215-222.
15. Morel D. W., Hessler J. R., Chisolm G. M. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res*. 1983;24: 1070-1076.
16. ICONTEC, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Normas Técnicas Colombianas NTC 4085, NTC 4086, NTC 4087. Bogotá D.E. 1994.
17. Azorín F. Curso de muestreo y aplicaciones. Ed. Aguilar. Madrid, 1969.
18. Brand Williams, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 1995;28 (1): 25-30
19. Godeberg, P. Daflon 500 mg in the treatment of haemorrhoidal disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo. *Angiology* 1994;45: 574-578.
20. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999;299: 152-178.
21. Wilsona Ted, Heather Marcha, William J. Banzb,c, Yuqing Houd, Stuart Adlerc, Cal Y. Meyersd, Todd A. Wintersb,c, Margaret A. Mahera. Antioxidant effects of phyto-and synthetic-estrogens on cupric ion-induced oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. *Life Sciences* 2002; 70: 2287-2297.
22. Menéndez R. Más, A.M. Amor, N. Ledón, J. Pérez, R.M. González, I. Rodeiro, M. Zayas, and S. Jiménez. Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D003, a mixture of very long-chain saturated fatty acids. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:13-21

23. Hörkkö Sohvi, Christoph J. Binder, Peter X. Shaw, Mi-Kyung Chang, Gregg Silverman, Wulf Palinski and Joseph L. Witztum. Immunological responses to oxidized LDL. Free Radical Biol Med 2000;28 (12): 1771-1779.

24. FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations, Grupo Intergubernamental sobre Frutos Cítricos. El mercado de Tangerinas de Estados Unidos: Situación actual y perspectivas a mediano plazo. Valencia, 1998

25. Hyson Dianne, Deborah Studebaker-Hallman, Paul Davis, Eric Gershwin. Apple Juice Consumption Reduces Plasma Low-Density Lipoprotein Oxidation in Healthy Men and Women. J Med Food 2000;3(4): 159-166.

Este trabajo fue recibido el 8 de Noviembre de 2005 y aceptado para ser publicado el 10 de Agosto de 2006.

Dirigir la correspondencia a:

Profesor

Julian Londoño

Sede de Investigación Universitaria

Facultad de Química Farmacéutica

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Teléfono: 574 210 6592

Fax: 574 2106590

E-mail: jlondono@farmacia.udea.edu.co