

Alimentos funcionales

Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga

A. Conchillo, I. Valencia, A. Puente, D. Ansorena e I. Astiasarán

Departamento de Bromatología, Tecnología de Alimentos y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. España.

Resumen

Buena parte del desarrollo de nuevos alimentos funcionales está encaminada al descubrimiento o aplicación de componentes de los alimentos que favorezcan la instauración de un perfil lipídico saludable en el organismo. El objetivo del trabajo fue realizar la caracterización de la fracción lipídica de dos tipos de aceites, de pescado y de alga, para valorar su potencial utilización como ingredientes funcionales, tanto en relación con el contenido en ácidos grasos de alto peso molecular como con la presencia de esteroides y otros componentes de la fracción insaponificable.

Ambos aceites presentaron una fracción lipídica muy rica en ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de alto peso molecular, con un 33,75% en el caso del aceite de pescado y un 43,97% en el de alga, siendo el EPA el ácido graso mayoritario en el pescado y el DHA en el alga. La relación ω -6/ ω -3 fue en ambos aceites inferior a 0,4. En cuanto a la fracción insaponificable, el aceite de alga presentó un contenido 3 veces menor de colesterol y una mayor proporción de escualeno. El contenido en fitosteroides fue significativamente superior en el aceite de alga.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:369-373)

Palabras clave: *Alimentos funcionales. Ácidos grasos ω -3. Fitosteroides. Colesterol. Alegaciones de salud.*

Introducción

La dieta constituye un factor clave en el mantenimiento de una buena salud cardiovascular. Las cualidades nutricionales de cada dieta vienen determinadas por los diferentes tipos de componentes que la integran. Actualmente, se recomienda que la ingesta de

FUNCTIONAL COMPONENTS IN FISH AND ALGAE OILS

Abstract

An important area of the development of new functional foods is focussed on finding or applying food components which favour achieving a healthier lipid profile in the organism. The objective of this work was to carry out the characterisation of the lipid fraction of two oils, fish oil and algae oil, to evaluate their potential use as functional ingredients, in relation to the high molecular weight fatty acid content and the presence of sterols and other components of the unsaponifiable fraction.

Both oils showed a lipid fraction rich in high molecular weight polyunsaturated ω -3 fatty acids, containing a 33.75% in the fish oil and a 43.97% in the algae oil. Eicosapentaenoic acid was the major fatty acid in fish oil, whereas docosahexaenoic was the most abundant fatty acid in algae oil.

The ω -6/ ω -3 ratio was lower than 0.4 in both oils. In the unsaponifiable fraction, algae oil had a lower cholesterol content and a higher proportion of squalene than fish oil. The phytosterol content was significantly higher in the algae oil.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:369-373)

Key words: *Functional foods. ω -3 fatty acids. Phytosterols. Cholesterol. Health claims.*

grasa suponga entre 30-35% del valor energético total aportado por la dieta, donde un 15-20% deberá corresponder a ácidos grasos monoinsaturados (AGM), un 7-8% a saturados (AGS), y un 5% a poliinsaturados (AGP).

Los ácidos grasos poliinsaturados resultan saludables debido a que disminuyen los niveles de colesterol en sangre, y en concreto de LDL-colesterol, siendo especialmente aconsejables los AGP ω -3 de alto peso molecular, ya que reducen los niveles de triglicéridos, la agregación plaquetaria y favorecen la respuesta inmunológica², aunque el mayor efecto beneficioso de este tipo de ácidos grasos poliinsaturados reside en su mecanismo antiarrítmico que favorece una mejora en

Correspondencia: I. Astiasarán
31080 Pamplona (Navarra)
E-mail: iastiasa@unav.es

Recibido: 25-IV-2005.
Aceptado: 23-XI-2005.

la evolución de las enfermedades cardiovasculares^{3,4}. Estudios recientes han sugerido que también tienen un papel fundamental en la disminución de riesgos derivados de enfermedades como la diabetes tipo 2^{5,6} o la hipertensión⁷.

Los aceites de pescado y de alga constituyen potenciales fuentes significativas tanto de AGP ω -3 de alto peso molecular, como de esteroides, y por tanto pueden ser considerados como ingredientes funcionales susceptibles de ser utilizados para el desarrollo de alimentos con efectos beneficiosos para la salud. En concreto, el aceite procedente de la microalga *Schizochytrium sp.* está autorizado como nuevo ingrediente alimentario estableciéndose un contenido en ácido docosahexaenoico (DHA) de, al menos un 32,0%⁸.

La fracción insaponificable de los alimentos que componen la dieta merece también una especial atención desde el punto de vista saludable. En cuanto a los terpenos destacan las vitaminas liposolubles (A, E y K) y compuestos como el escualeno, precursor del colesterol, y al que se atribuye cierta capacidad antioxidante. En el grupo de compuestos esteroideos destacan los esteroides: en los tejidos animales el colesterol y su precursor, el lanosterol y en los tejidos vegetales los fitosteroides. Los fitosteroides son considerados en la actualidad como compuestos funcionales con demostrada actividad hipocolesteromiantes⁹, pudiendo disminuir los niveles de colesterol total y LDL-colesterol entre un 5-15%¹⁰. Por esta razón han sido también autorizados por la UE para su adición a cierto tipo de alimentos. Está permitido su uso en grasas amarillas para untar, aliños para ensaladas, productos de tipo leche, productos de tipo leche fermentada, bebidas de soja y productos tipo queso con fitosteroides/fitoestanoles¹¹; grasas amarillas para untar, productos tipo leche, productos tipo yogur y salsas aromáticas con fitosteroides/fitoestanoles¹²; grasas amarillas para untar, bebidas de fruta a base de leche, productos tipo yogur y productos tipo queso, con fitosteroides/fitoestanoles¹³; grasas amarillas para untar con ésteres de fitosterol¹⁴, productos tipo leche y productos tipo yogur con ésteres de fitosterol¹⁵ y bebidas a base de leche con fitosteroides/fitostanoles añadidos¹⁶.

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio comparativo de la fracción lipídica de dos tipos de aceites, pescado y alga, para valorar su potencial utilización como ingredientes funcionales, en relación no sólo a su contenido en ácidos grasos de alto peso molecular, sino también por su aporte en esteroides y otros componentes de síntesis de la fracción insaponificable.

Material y métodos

Se analizaron muestras de aceite de pescado desodorizado y aceite de alga suministradas respectivamente por LYSI (Reikiavik, Islandia) y DHASCO®-S, Market Biosciences Corporation (Columbia, USA).

Los ácidos grasos se determinaron por cromatografía gaseosa, usando trifluoruro de boro/metanol para la for-

mación de metilésteres de dichos ácidos grasos¹⁷. El cromatógrafo de gases utilizado fue un Clarus 500 con una columna capilar SpTM-2.560 (100 m \times 0,25 mm \times 0,2 μ m) y un detector de ionización de llama. La temperatura de inyección fue de 250 °C y la del detector a 260 °C. El programa de temperaturas del horno fue de 175 °C durante 10 minutos, seguida de una rampa de 10 °C/min hasta alcanzar 200 °C, y de una segunda rampa de 4 °C/min hasta los 220 °C, manteniéndose esa temperatura durante 15 minutos. El gas portador fue hidrógeno a una presión de 20,5 psi. La velocidad de flujo fue de 120 cm/s. La identificación de los metilésteres de los ácidos grasos se realizó comparando los tiempos de retención de los picos obtenidos en la muestra con los estándares de ácidos grasos inyectados individualmente (Sigma, St. Louis, MO, USA). Para realizar la cuantificación de los ácidos grasos se usó el metiléster de ácido heptadecanoico como patrón interno (Sigma, St. Louis, MO, USA).

La determinación de compuestos de la fracción insaponificable se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa previa saponificación en caliente, extracción y derivatización según Sweley y cols.¹⁸. El cromatógrafo de gases utilizado fue un Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna HP-5MS (30 m \times 250 μ m \times 0,25 μ m) acoplado a un detector de masas. El programa de temperatura del horno utilizada fue 60 °C durante 0,5 minutos, seguida de una rampa de 50 °C/min hasta alcanzar 290 °C y una segunda rampa de 0,5 °C/minuto hasta 297 °C. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el 5 α -colestano (Sigma, St. Louis, MO, USA) como patrón interno.

Tratamiento estadístico: Se analizaron dos muestras y se realizaron cuatro repeticiones de cada parámetro. El conjunto de resultados fue agrupado para cada parámetro, mediante el cálculo del valor medio y desviación estándar. Se realizó un test *t*-Student para establecer diferencias significativas entre las muestras de aceite de pescado y de alga. Se consideraron diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$. El programa estadístico aplicado fue SPSS (SPSS versión 11.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Resultados y discusión

Para este trabajo se seleccionaron 2 aceites ricos en AGP, un aceite desodorizado obtenido a partir de una mezcla de diferentes pescados que se utiliza como suplemento de ácidos grasos (ω -3), y un aceite procedente de microalgas *Schizochytrium sp.*, autorizado por la UE para ser utilizado como nuevo ingrediente alimentario y fuente de DH8.

En la tabla I se muestra cómo ambos tipos de aceite presentan altas cantidades de AGP ω -3 de alto peso molecular (20 átomos de carbono o más), siendo mayor en el caso del aceite de alga (43,9%) que en el de pescado (32,59%). En concreto, el aceite de pescado contiene un 16,92% de ácido eicosapentaenoico (EPA) y 13,44% de DHA. Además, este aceite presenta también 2,23% de ácido docosapentaenoico ω -3 (DPA 3). En

Tabla I
Perfil de ácidos grasos de las muestras de aceite de pescado y de alga (g/100 g ácidos grasos)

	Aceite de pescado	Aceite de alga	NS
Láurico C12:0	0,16; 0,01	0,32; 0,00	***
Mirístico C14:0	7,04; 0,35	9,09; 0,00	***
Palmítico C16:0	17,33; 0,59	22,86; 0,00	***
t-Palmitoleico C16:1t	0,57; 0,18	0,07; 0,00	***
Palmitoleico C16:1	7,96; 0,40	0,21; 0,00	***
Esteárico C18:0	3,50; 0,07	0,57; 0,00	***
Elaídico C18:1t	1,17; 0,11	0,01; 0,00	***
Oleico C18:1(ω-9)	8,69; 0,29	1,11; 0,02	***
Vaccénico C18:1(ω-7)	3,11; 0,11	0,13; 0,01	***
t-Linoleico C18:2t	0,06; 0,02	0,06; 0,00	ns
Linoleico C18:2(ω-6)	1,26; 0,05	0,46; 0,02	***
Araquídico C20:0	0,20; 0,01	0,00; 0,00	***
γ-linolénico C18:3(ω-6)	0,22; 0,02	0,22; 0,00	ns
α-linolénico C18:3(ω-3)	1,16; 0,07	0,09; 0,00	***
Behénico C22:0	0,05; 0,00	0,03; 0,00	***
Brasídico C20:1t	1,84; 0,02	0,41; 0,00	***
Erúrico C22:1	0,05; 0,00	1,71; 0,00	***
Araquidónico C20:4(ω-6)	1,14; 0,10	0,51; 0,01	***
Eicosapentaenoico C20:5(ω-3)	16,92; 2,03	1,25; 0,01	***
Docosapentaenoico C22:5(ω-6)	0,00; 0,00	15,44; 0,00	***
Nervónico C24:1	0,60; 0,00	0,00; 0,00	***
Docosapentaenoico C22:5(ω-3)	2,23; 0,00	0,22; 0,00	***
Docosahexaenoico C22:6(ω-3)	13,44; 0,58	42,41; 0,02	***

NS: Nivel de significación; ***: $p < 0,001$; ns: no significativo: $p > 0,05$.

el aceite de alga prácticamente toda esta fracción corresponde al DHA, que representa el 42,41% del aceite. En la fracción AGP hay que señalar también la presencia significativa en el aceite de alga de un compuesto de la familia (ω-6, el DPA (C22:5 ω-6). Estos perfiles hacen que estos aceites sean fuentes naturales excepcionalmente significativas de ácidos grasos poliinsaturados de alto peso molecular, especialmente de la familia ω-3, y por tanto, susceptibles efectivamente, de ser considerados ingredientes con propiedades saludables derivadas de dicho aporte. En relación con otros AGP, hay que señalar la mayor presencia de ácidos grasos esenciales, linoleico y α-linolénico en el aceite de pescado. Por otra parte, no se detectan diferencias significativas entre los 2 aceites para el ácido γ-linolénico. En la actualidad la ingesta adecuada establecida para el ácido linoleico y α-linolénico, dependiendo de la edad y sexo, está en torno a 10-17 y 1,0-1,6 g/día, respectivamente¹⁹. Si se compara el aporte en ácidos grasos esenciales de estos aceites con el de aceites vegetales comestibles se puede observar que los aceites analizados son especialmente pobres en ácido linoleico. Los aceites de maíz, girasol o soja tienen cantidades de linoleico del orden de 45-50 mg/100 g y el aceite de oliva del orden de 7-11 g/100 g. En cuanto al ácido α-linolénico, su aporte por parte del aceite de pescado puede ser incluso superior al de algunos aceites vegetales. Así, los aceites de oliva o de girasol presentan can-

tidades por debajo de 0,7 g/100 g²⁰. El aceite de alga no puede ser considerado fuente significativa del ácido α-linolénico.

En relación con el resto de ácidos grasos, se observan algunas diferencias especialmente significativas. En la fracción de AGS, destacan las diferencias en los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico, siendo los tres primeros más abundantes en el aceite de alga. Por el contrario, el ácido esteárico, considerado precursor del oleico, se encuentra en mayor cantidad en el aceite de pescado. El ácido esteárico (C 18:0), al contrario que el resto de AGS tiene poco o ninguna influencia sobre la capacidad de aumentar el nivel de colesterol sérico^{21,22}. En cuanto a la fracción de AGM se observa una mayor presencia de los principales ácidos de esta fracción, palmitoleico y oleico, en el aceite de pescado que en el aceite de alga, donde su aporte no llega al 2%. En cualquier caso, la cantidad de ácido oleico del aceite de pescado (8,7%) está muy por debajo del que presentan otros aceites vegetales, con valores superiores al 20% en girasol y 50% en oliva.

El perfil de ácidos grasos queda resumido en el sumatorio de las diferentes fracciones y en las relaciones con significado desde el punto de vista nutricional y saludable en las tablas II y III. Existe una gran diferencia entre las fracciones de AGM y AGP. El contenido en AGM del aceite de alga es muy pequeño (3,16 g/100 g), mientras que su contenido es AGP es significativamente mayor (60,6 g/100 g frente al 36,37 g/100 g en el aceite de pescado). Ambos aceites, sobre todo el de pescado, presentan una relación ω-6/ω-3, muy baja, de modo que su utilización como ingrediente funcional en otro tipo de alimentos puede contribuir a lograr relaciones entre 1-4:1, consideradas idóneas en una dieta saludable²³. La presencia de ácidos grasos trans (AGT) fue muy escasa en el aceite de alga (0,55%) y algo mayor en el aceite de pescado (3,64%).

La tabla IV muestra el perfil obtenido del análisis de la fracción insaponificable en ambos tipos de aceites. Se puede observar la presencia de más del doble de contenido de escualeno en el aceite de alga respecto al

Tabla II
Sumatorio de ácidos grasos en aceite de alga y pescado (g/100 g ácidos grasos)

	Aceite de pescado	Aceite de alga	NS	
ΣAGS	28,28; 1,03	32,87; 0,00	***	
ΣAGM	20,41; 2,84	3,16; 0,02	***	
ΣAGP	ω-6	2,62; 0,05	16,63; 0,00	***
	ω-3	33,75; 0,05	43,97; 0,00	***
	Total	36,37; 0,79	60,6; 0,03	***
ΣTrans	3,64; 0,00	0,55; 0,00	***	

NS: Nivel de significación: ***: $p < 0,001$.

Tabla III
Relaciones de sumatorios de ácidos grasos

	Aceite de pescado	Aceite de alga	NS
AGP + AGM/AGS	2,01	1,94	ns
AGP/AGS	1,29	1,84	***
$\omega 6/\omega 3$	0,08	0,38	***

NS: Nivel de significación: ***: $p < 0,001$; ns: no significativo: $p > 0,05$.

de pescado (266,4 mg/100 g y 109,3 mg/100 g, respectivamente). El escualeno es un terpeno precursor del colesterol y otros esteroides, al que se le atribuyen propiedades antioxidantes y cardioprotectoras en estudios con animales²⁴. Chan y cols.²⁵ observaron una reducción en LDL-colesterol del 14% en un estudio con humanos incluyendo un suplemento rico en escualeno. Dessi y cols²⁶ sugieren, en un estudio sobre la estabilidad frente a la oxidación de los AGP, que el escualeno actuaría principalmente como secuestrante de los radicales peróxidos formados en el proceso de autooxidación. Los aceites vegetales comestibles contienen cantidades en general mucho más bajas (3-30 mg/100 g), excepto el aceite de oliva que presenta cantidades muy elevadas (100-700 mg/100 g)²⁷.

En el aceite de pescado, el contenido en colesterol fue más de tres veces superior al encontrado en el aceite de alga. Así, 100 g de aceite de pescado aportarían 541 mg de colesterol frente a los 154 mg aportados por el aceite de alga. Por el contrario el aceite de alga presentó un contenido total de Stigmasterol, cicloartanol y lanosterol de 264,7 mg/100 g aceite frente al 18,7 mg/100 g aceite en el de pescado. Estos resultados ponen de manifiesto que el aceite de alga analizado constituye una fuente significativa de estos compuestos. El estigmasterol es el fitosterol que se encuentra presente en mayor cantidad (156,26 mg/100 g producto). Se trata de un compuesto del grupo de los 4-desmetilesteroides y por tanto con una estructura análoga al

Tabla IV
Componentes de la fracción insaponificable de las muestras de aceite de pescado y de alga (mg/100 g muestra)

	Aceite de pescado	Aceite de alga	NS
Escualeno	109,32; 2,68	266,4; 1,53	***
Colesterol	541,5; 8,82	154,38; 3,97	***
Stigmasterol	9,54; 0,34	156,26; 0,83	***
Cicloartanol	9,19; 0,16	92,47; 4,26	***
Lanosterol	0,00; 0,00	15,93; 1,12	***

NS: Nivel de significación: ***: $p < 0,001$.

colesterol, capaz de competir con él en su absorción intestinal. Efectivamente, parece que sólo los 4-desmetilesteroides afectan a la absorción del colesterol y disminuye la concentración de colesterol total y LDL colesterol²⁸⁻³⁰.

El cicloartanol, presente en el aceite de alga en una cantidad también significativa (92,47 mg/100 g aceite), se encuadra en el grupo de los 4,4-dimetilesteroides, que se encuentran en general, en menores cantidades en los vegetales. Parece que los esteroides de este grupo no poseen un efecto hipocolesterolemico³¹.

En el aceite de pescado las cantidades de estigmasterol y cicloartanol son similares y bajas (9,54 y 9,19 mg/100 g, respectivamente).

En conclusión, ambos aceites presentaron una fracción lipídica muy rica en ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de alto peso molecular, sobre todo de EPA y DHA, mostrándose así mismo relaciones ω -6/ ω -3 idóneas para lograr disminuir este cociente en alimentos a los que se puedan incorporar como ingredientes funcionales. En cuanto a la fracción insaponificable, el aceite de alga presentó un contenido 3 veces menor de colesterol y una mayor proporción de escualeno y fitosteroides, que poseen potenciales beneficios saludables.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de LYSI (Reykjavik, Islandia), de DHASCO®-S Market Biosciences Corporation (Columbia, USA), Gobierno de Navarra (Departamento de Industria) y al MCYT (Programa Ramón y Cajal, 2002) por su contribución al desarrollo de este trabajo.

Referencias

- Mataix J, Quílez JL, Rodríguez J: Aporte de grasa: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías Alimentarias para la población española. Madrid, 1995:231-237.
- Connor WE: Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutri* 2000; 71 (suppl):171S-5S.
- Ismail, HM: The role of omega-3 fatty acids in cardiac protection: an overview. *Front Biosci* 2005; 1 (10):1079-1088.
- Singer P, Wirth M: Can n-3 PUFA reduce cardiac arrhythmias? Results of a clinical trial. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 71 (3):153-159.
- He K, Daviglus M: A few more thoughts about fish and fish oil. *J Am Diet Assoc* 2005; 105 (3):350-351.
- Nettleton J, Katz R: n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *J Am Diet Assoc* 2005; 105 (3):428-440.
- Etherton PM, Harris WS, Appel LJ: Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106 (21):2747-2757.
- Decisión 2003/427/CE de la Comisión, de 5 de junio de 2003, relativa a la comercialización de aceite rico en DHA (ácido docosahexaenoico) procedente de la microalga *Schizochytrium sp.* como nuevo producto alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Consejo [notificada con el número C(2003) 1789].
- Plant J, Mensink RP: Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001; 11:31-40.

10. Jones PJH, Howell T, MacDougall DE, Feng JY, Parsons W: Short term administration of tall oil phytosterols improves plasma lipid profiles in subjects with different cholesterol levels. *Metabolism* 1998; 47:751-756.
11. Decisión de la Comisión 2004/333/EC, de 31 de marzo de 2004, relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, aliños para ensaladas, productos de tipo leche, productos de tipo leche fermentada, bebidas de soja y productos tipo queso con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo [notificada con el número C(2004) 12431].
12. Decisión de la Comisión 2004/334/CE, de 31 de marzo de 2004, relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, productos tipo leche, productos tipo yogur y salsas aromáticas con fitosteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo [notificada con el número C(2004) 1244].
13. Decisión de la Comisión 2004/336/EC, de 31 de marzo de 2004, relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, bebidas de fruta a base de leche, productos tipo yogur y productos tipo queso, con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo [notificada con el número C(2004) 1246].
14. Decisión 2000/500/CE de la Comisión, de 24 de julio de 2000, relativa a la autorización de la comercialización de las «grasas amarillas de untar con ésteres de fitosterol» como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo.
15. Decisión de la Comisión 2004/335/CE, de 31 de marzo de 2004, relativa a la autorización de comercialización de productos tipo leche y productos tipo yogur con ésteres de fitosterol añadidos como nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo [notificada con el número C(2004) 1245].
16. Decisión de la Comisión 2004/845/CE, de 12 de noviembre de 2004, relativa a la autorización de la comercialización de bebidas a base de leche con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevos alimentos o nuevos ingredientes alimentarios con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo [notificada con el número C(2004) 4289].
17. AOAC: Methyl esters of fatty acids in oils and fats 969.33 (Chap 41; pp. 19-20). 2002. In Official methods of analysis, (17th ed) Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemist.
18. Sweeley CC, Bentley R, Makita M, Wells WN: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J Am Oil Chem Soc* 1963, 85:2497-2507.
19. Dietary Reference Intakes of energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. 2002. www.nap.edu
20. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C: Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide. Madrid. 2001.
21. Yu S, Derr J, Etherton TD, Kris-Etherton PM: Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterlemic. *Am J Clin Nutr* 61:1129-1139.
22. Walden CE, Retzlaff BM, Buck BS, McCann RH, Knopp RH: Lipoprotein lipid response to the national cholesterol education program step 11 diet by hypercholesterolemic and combined hyperlipidemic women and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:375-382.
23. Simopoulos AP: The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002; 56:365-379.
24. Sabeena Farvin KH, Anandan R, Hari Senthil Kumar, S Shiny KS, Sankar TV, Thankappan TK: Effect of squalene on tissue defense system in isoproterenolinduced myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res* 2004; 50 (3):231-236.
25. Chan P, Tomlinson B, Lee CR, Lee YS: Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia. *J Clin Pharmacol* 1996; 36:422-427.
26. Dessi MA, Deiana M, Day BN, Rosa A, Banni S, Corongiu FP: Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids: effect of squalene. *Eur J Lipid Sci Technol* 2002; 104:506-512.
27. Kamm W, Dionisi R, Hischenhuber C, Engel KH: Authenticity assessment of fats and oils. *Food Rev Int* 2001; 17(3):249-290.
28. Weststrate JA, Meijer GN: Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52:334-343.
29. Sierksma A, Weststrate LA, Meijer GW: Spreads enriched with plant sterols, either 4,4-dimethylsterols, and plasma total- and LDL-cholesterol concentrations. *Br J Nutr* 1999; 82:273-282.
30. Vissers MN, Zock PL, Meijer GW, Katan MB: Effect of plant sterols from rice bran oil and triterpene alcohols from sheanut oil serum lipoprotein concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:1510-1515.
31. Salo P, Wester I, Hopia A: Lipids for functional foods and nutraceuticals. The oily press. 813-224. Bridgwater, 2003.