



**Universitat de Lleida  
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària  
Departament de Tecnologia d'Aliments**

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y  
LA BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS  
FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA.  
PRIMERAS ETAPAS EN EL DESARROLLO DE UN  
ACEITE DE OLIVA FUNCIONAL.**

**ARANTZA SOLER CANTERO  
TESIS DOCTORAL  
Noviembre, 2009**





**Universitat de Lleida**  
**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària**  
**Departament de Tecnologia d'Aliments**

**Memoria presentada por: Arantza Soler Cantero para optar al  
Grado de Doctor por la Universitat de Lleida**

**Dirigida por :**

**Dra. M<sup>a</sup> José Motilva Casado**

**Dra. M<sup>a</sup> Paz Romero Fabregat**

**Lleida, Noviembre de 2009**



**Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Antioxidantes del Departamento de Tecnología de Alimentos de La Universidad de Lleida, dentro del programa de Doctorado: “Sistemes Agrícoles, Forestals i Alimentaris”.**

**Parte de los estudios de los capítulos II y III fueron realizadas en la “Unitat de Recerca en Lípids i Ateriosclerosis (CIBERDEM)” del Hospital Universitari St. Joan de Reus de la Universidad Rovira i Virgili, en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de Lleida y en el “Institute of Food Research” situado en Norwich, Inglaterra, Reino Unido.**

**Para su realización se contó con el apoyo del AGAUR (Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca), Generalitat de Catalunya y de los Fondos Sociales Europeos.**

.



**Candidata a Grado de Doctor  
Arantza Soler Cantero**

-----  
**Directora  
Dra. María José Motilva Casado  
Firma de Aprobación:**

-----  
**Directora  
Dra. María Paz Romero Fabregat  
Firma de Aprobación:**

-----









**AGRADECIMIENTOS:**



## **RESUMEN:**

El aceite de oliva es la principal fuente de grasa de la "dieta mediterránea". En las últimas décadas esta dieta se ha redescubierto como un modelo de alimentación capaz de mejorar la salud de los que la consumen. Los últimos estudios indican que el aceite de oliva es más que una grasa monoinsaturada, atribuyéndose a su contenido en compuestos fenólicos una parte de los efectos beneficiosos sobre la salud. Además, a diferencia de otros aceites vegetales, el aceite de oliva virgen se consume sin refinar y no se utilizan disolventes para su extracción; por ello, conserva una importante cantidad de fenoles del fruto.

Los compuestos fenólicos, denominados a veces impropriamente polifenoles, derivan del metabolismo secundario de las plantas. Son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. Los componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva son muy variados y se clasifican en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides, y dentro de este último tenemos a los ácidos fenólicos, secoiridoides, lignanos, etc.

Ya hace más de 40 años que se establecieron líneas de investigación acerca de los fenoles hidrofílicos del aceite de oliva virgen, planteándose entre otras cosas la importancia de la naturaleza antioxidante de estos sobre la salud de los consumidores y la posibilidad de desarrollar otras actividades biológicas de interés.

Existen muchos estudios epidemiológicos, "*in vitro*" e incluso "*in vivo*", que corroboran las diferentes actividades biológicas que son capaces de desarrollar los compuestos fenólicos del aceite de oliva y que podrían resultar beneficiosas para la salud de los que lo consumen. Se les ha otorgado capacidad antioxidante, anticancerígena, antitrombótica, antiinflamatoria, antitumoral y antimicrobiana.

En la actualidad se sigue tratando de demostrar el efecto beneficioso sobre la salud humana de la capacidad antioxidante de estos compuestos. Además, cada vez tiene mayor importancia el conocer su biodisponibilidad para poder determinar claramente su actividad biológica.

Pero todavía no se conoce con seguridad si estos compuestos alcanzan los lugares, dentro del organismo humano, donde podrían ser útiles dichas propiedades. Por tanto es necesario realizar más investigaciones relacionadas con el grado de biodisponibilidad de dichos compuestos. Conocer más acerca de las consecuencias de la digestión y de los canales de transporte y absorción de los compuestos fenólicos es un objetivo interesante de alcanzar.

Una vez quede esto desarrollado, podrá plantearse la creación de aceites de oliva enriquecidos con antioxidantes.



## **RESUM:**

L'oli d'oliva és la principal font de greix de la "dieta mediterrània". Durant les últimes dècades aquesta Dieta s'ha redescobert com un model d'alimentació capaç de millorar la salut dels que la consumeixen. Els últims estudis indiquen que l'oli d'oliva és més que un greix monoinsaturat, atribuint-se al seu contingut en compostos fenòlics una part dels efectes beneficiosos per a la salut. A més, a diferència d'altres olis vegetals, l'oli d'oliva verge es consumeix sense refinar i no s'utilitzen dissolvents per a la seva extracció; tant es així, que conserva una important quantitat dels fenols del fruit.

Els compostos fenòlics, anomenats alguns cops impròpiament polifenols, deriven del metabolisme secundari de les plantes. Són estructures químiques formades per un anell aromàtic unit a un o més grups hidroxil, incloent-hi també derivats funcionals com ésters, metil ésters, glicòsids, etc. Els components de la fracció fenòlica de l'oli d'oliva són molt variats i es classifiquen en dos grans grups: flavonoides i no flavonoides, i dins d'aquest últim tenim els àcids fenòlics, secoiridoïdes, lignans, etc.

Ja fa més de 40 anys que es van establir línies d'investigació sobre els fenols hidrofílics de l'oli d'oliva verge, plantejant-se entre altres la importància de la naturalesa antioxidant d'aquests sobre la salut dels consumidors i la possibilitat de desenvolupar altres activitats biològiques d'interès.

Existeixen molts estudis d'interès epidemiològics "*in vitro*" i també "*in vivo*" que corroboren les diferents activitats biològiques que són capaços de desenvolupar els compostos fenòlics de l'oli d'oliva i que podrien resultar beneficiosos per a la salut dels qui el consumeixen. Se'ls ha atorgat capacitat antioxidant, anticancerígena, antitrombòtica, antiinflamatòria, antitumoral i antimicrobiana.

En l'actualitat es continua intentant demostrar l'efecte beneficiós sobre la salut humana de la capacitat antioxidant d'aquests compostos. A més, cada cop té més importància conèixer la seva biodisponibilitat per poder determinar clarament la seva activitat biològica.

Però encara no es coneix amb seguretat si aquests compostos arriben a llocs, dintre de l'organisme humà, on podrien ser útils les propietats esmentades. Per tant és necessari realitzar més investigacions relacionades amb el grau de biodisponibilitat d'aquests compostos. Conèixer més sobre les conseqüències de la digestió i dels canals de transport i absorció dels compostos fenòlics és un objectiu interessant d'assolir.

Un cop quedi això desenvolupat, podrà plantejar-se la creació d'olis d'oliva enriquits amb antioxidants.





## **ABSTRACT:**

Olive oil is the most important source of fat in the "Mediterranean diet". In recent decades this diet has been rediscovered as a model of good nutrition capable of improving the health of those who follow it. The most recent studies indicate that olive oil is more than simply a monounsaturated fat, attributing its content of phenolic compounds as the element which is most beneficial to one's health. Furthermore, in contrast with other vegetable oils, virgin olive oil is consumed unrefined without a use of solvents in its production. This allows a large quantity of fruit phenolics to be preserved.

Phenolic compounds, often incorrectly called polyphenols, come from the second stage of plant metabolism. They are chemical structures formed by an aromatic ring joined to one or more hydroxyl groups including also functional derivatives like esters, methyl esters, glycosides, etc. The compounds of the phenolic fraction of olive oil are very diverse and classified to two major groups: flavonoids and non flavonoids. In this last group we find phenolic acids, secoiridoids, lignans, etc.

Hydrophilic phenols of virgin olive oil have been studied for the last 40 years, raising amongst other things the importance of natural antioxidants in the health of consumers and the possibility to develop other important biological activity.

There are many epidemiological studies both "in vitro" and "in vivo" which corroborate different biological activities which phenolic compounds derived from olive oil can produce, which would directly benefit the consumer health. Such benefits include antioxidant capacity, anti-carcinogenic, anti-thrombotic, anti-inflammatory, anti-tumor and anti-microbial.

Even now they are trying to demonstrate the beneficial effect of the antioxidant capacity of these compounds on human health. Furthermore, the knowledge of its bioavailability is becoming more and more important to clearly understand its biological activity.

But we still don't know with certainty if these compounds reach the places inside the human body, where they could be useful in the ways just discussed. Therefore it is necessary to undertake more research related to the level of bioavailability of the said compounds. To learn more about the consequences of the digestion and of the channels of transportation and absorption of the phenolic compounds is of high interest.

Once this has been developed, we could begin to create olive oils enriched with antioxidants.

.



## **ÍNDICE:**

1.	LISTA DE ABREVIATURAS .....	21
2.	ÍNDICE DE TABLAS .....	27
3.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	31
4.	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	39
4.1	EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN ¿ALIMENTO FUNCIONAL? .....	41
4.1.1	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA.....	41
4.2	COMPUESTOS FENÓLICOS.....	44
4.2.1	CLASIFICACIÓN.....	44
4.2.2	FUNCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	45
4.2.3	FRACCIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA.....	46
4.3	FENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	53
4.3.1	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	56
4.4	BIODISPONIBILIDAD Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA FRACCIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA .....	65
4.4.1	BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	65
4.4.2	PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA FRACCIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA.....	75
4.5	LA ACTUALIDAD EN EL ÁREA DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES: PERFILES NUTRICIONALES, DECLARACIONES NUTRICIONALES Y DECLARACIONES DE SALUD. ....	84
4.6	BIBLIOGRAFÍA .....	90
5.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	107
6.	OBJETIVOS.....	113
7.	PLAN DE TRABAJO.....	117
8.	CAPÍTULO II: RESULTADOS. Determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva .....	121
8.1.	ACCIÓN ANTIOXIDANTE SOBRE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LAS LIPOPROTEINAS HUMANAS DE BAJA DENSIDAD “LDL” .....	121
8.2.	ACCIÓN ANTIOXIDANTE SOBRE LA FRACCIÓN PROTEICA DE LAS LIPOPROTEINAS HUMANAS DE BAJA DENSIDAD .....	121

9.	CAPÍTULO III: RESULTADOS Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva.....	165
9.1	ESTUDIOS “IN VITRO”: EFECTOS DE LA DIGESTIÓN SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA .....	165
9.2	ESTUDIO “EX VIVO”: METABOLISMO Y TRANSPORTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA A TRAVÉS DEL MODELO CELULAR CACO 2-TC7 165	
9.3	ESTUDIOS “IN VIVO”: CARACTERIZACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA EN HUMANOS .....	165
10.	CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GLOBAL .....	211
	BIBLIOGRAFÍA .....	251
11.	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	259



## 1. LISTA DE ABREVIATURAS



ABREVIATURAS	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GLOBAL
3,4-DHPEA	Hidroxitirosol ó 3,4-dihidroxifeniletanol
3,4-DHPEA-AC	4-acetoxietil-1,2-dihidroxibenceno
3,4-DHPEA-EA	forma aldehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol
3,4-DHPEA-EDA	forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol
5-HIAA	Acido hidroxiindolacetico
8-OHdG	8-oxo-7,8-dihidroguanina
AAS	Semialdehído
AAR	Alianza para la investigación del envejecimiento
AASA	Semialdehido aminoadipico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AOM	Metodo del oxigeno activo
Apo	Apoproteinas
ArO·	Radical aroxil
ArOH	Antioxidantes de naturaleza fenólica
BHT	hidroxitolueno butirato
CBG	β-glucosidasa citosólica
CD	Dienos conjugados
CE	Comunidad Europea
CG-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
CIIC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cancer
CML	Celulas musculares lisas
COMT	Catecol-O-metil-transferasa
DOPAC	acido dihidroxifenilacetico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FL	Fosfolípidos
FRAP	Poder antioxidante del hierro reducido
GGs	Semialdehido Glutámico
GPX	Glutationreductasa
GSA	Glutamilsemialdehido
LDL	Lipoproteína de bajadensidad
GSH	Glutation
GSSG	Glutation oxidado
H+	Hidrogenión
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HO <sub>2</sub> ·	Hidroperoxilo
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución - Diodo array
L	Lípidos
LCAT	Lecitina-colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL-ox	Lipoproteína de baja densidad oxidada

LOO	Radical peroxy
LPH	Lactato florizin hidrolasa
MDA	Malondialdehído
MDAL	Malondialdehyde lysine
Metilada del 3,4-DHPEA-EA	Forma metilada de la oleuropeina aglicona
NADPH	Nicotinamina-adenina Dinucleotido fosfato reducido
NDA	Grupo científico encargado de los productos dietéticos, la nutrición y las alergias
NO	Oxido nítrico
O <sub>2</sub> ·	Superóxido
OGPC	1-oleoilglicerofosfocolina
OH·	Hidroxilo
OMS	Organización Mundial dela Salud
OOL	Diolenoleina
OOO	Trioleina
ORAC	Capacidad de absorbanca del oxigeno reactivo
PGPC	1-palmitoil-2-glutaril-sn-glicero-3-fosfocolina
p-HPEA	Tirosol ó 2-(4-hidroxifenil etanol).
p-HPEA-EA	Forma aldehídica del ácido elenólico unida al tirosol
p-HPEA-EDA	Forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol
PLPC	1-palmitoilisofosfatidilcolina
POO	Dioloalmitina
POVPC	1-palmitoil-2-(5-oxovaleril)-sn-glicero-3-fosfocolina
POX	Paraoxonasa
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SGLT1	Transportador de glucosa 1 dependiente de sodio
SGPC	1-stearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
SOD	Superoxidodismutasa
SULTH	Sulfotransferasa Humana
SULTA1	Sulfotransferasa 1
SULTA13	Sulfotransferasa 13
TBA	Ácido tiobarbitúrico
tB-OOH	<i>Tert</i> -butilhidroperóxido
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de trolox
TG	Trigliceridos
TGF-alfa	Factor transformador del crecimiento tipo alfa
TOF	detector de masas de tiempo de vuelo
UDPGT	UDP glucuronosil transferasa
UE	Unión Europea
UGT1A	UDP glucuronosyltransferasa de la familia 1, unido al polipéptido A
UV	Ultravioletas



ABREVIATURAS	<p><b>CAPÍTULO II: 8.1</b></p> <p><b>CAPÍTULO II: 8.2</b></p> <p><b>CAPÍTULO III: 9.1 Y 9.2</b></p> <p><b>CAPÍTULO III: 9.3</b></p>
3,4 DHPEA-EDA	Dialdehydic form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol
3,4-DHPEA-AC	4-(acetoxylethyl)-1,2-dihydroxybenzene
3,4-DHPEA-EA	Oleuropein aglycone
3,4-DHPEA-EDA	4-hexenoic acid, 4-formyl-3-(2-oxoethyl)-2-(3,4 dihydroxyphenyl) ethyl ester or Dialdehydic form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol
5-HIAA	5-hydroxyindole acetic acid
AASA	Aminoadipic semialdehyde
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
DAD	Diode-array detector
DNP	2,4-dinitrophenylhydrazine
DOPA	Dihydroxyphenylalanine
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray ionisation
GC	Gas chromatography
GLM	General Linear Models
GSA	Glutamic semialdehyde
GSH-Px	Glutathione peroxidase
HDL	High-density lipoprotein
HPLC	High-performance liquid chromatography
LDL	Low density lipoprotein
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MAO	Monoamine oxidase
MCO	Metal-catalyzed oxidation
MDAL	Malondialdehyde lysine
methyl 3,4-DHPEA-EA	Methylated form of oleuropein aglycone
MS	Mass spectrometer
MS/MS	Tandem mass spectrometry
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MUFA	Monounsaturated fatty acid
NO	Nitric oxide
OGPC	1-oleoylglycerophosphocholine
OH-tyrosol	2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl alcohol
oxLDL	Oxidized low-density lipoprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PGPC	1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine
<i>p</i> -HPEA-EA	Aldehydic form of elenolic acid linked to tyrosol
<i>p</i> -HPEA-EDA	Dialdehydic form of elenolic acid linked to tyrosol or 4-hexenoic acid, 4-formyl-3-(2-oxoethyl) 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl ester

PI	Peroxidizability index
PLPC	1-palmitoyllysophosphatidylcholine
POVPC	1-palmitoyl-2-(5-oxovaleryl)-sn-glycero-3-phosphocholine
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
Q-TOF	Quadrupole time of flight
RSD	Relative standard deviation
S/N	Signal-to-noise ratio
SEM	Standard error of the mean
SFA	Saturated fatty acids
SGPC	1-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
SIM	Selected-ion monitoring
SPE	Solid-Phase-Extraction
SRM	Selected reaction monitoring
TEER	Trans-epithelial electrical resistance
UPLC	Ultraperformance liquid chromatography
UV	Ultraviolet
VLDL	Very low density lipoprotein
VOO	Virgin olive oil

---



## 2. ÍNDICE DE TABLAS



TABLAS	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	Página
Tabla I 1	Composición característica básica de los ácidos grasos mayoritarios del aceite de oliva.	42
Tabla I 2	Componentes de la fracción minoritaria no glicérida del aceite de oliva.	43
Tabla I 3	Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica enunciada por Harborne.	45
Tabla I 4	Declaraciones nutricionales permitidas y sus condiciones de aplicación	85

TABLAS	CAPÍTULO II: 8.1	Página
Table 8.1 1	Prolongation of the lag-phase of LDL after incubation with 0.2 $\mu$ M of phenolic compounds alone or in combination relative to control LDL (without phenolic compounds) and the expected effect.	132
Table 8.1 2	Concentration of phenolic compounds in the virgin olive oil consumed by the volunteers	133

TABLAS	CAPÍTULO II: 8.2	Página
Table 8.2 1	Effect of Cu <sup>++</sup> and phenolic in LDL fatty acid composition.	152

TABLAS	CAPÍTULO III: 9.1 Y 9.2	Página
Table 9.1-2 1	Relative amounts of phenols in test oil, digesta and aqueous micellar fraction after <i>in vitro</i> digestion of virgin olive oil (VOO). The results are expressed as total nmols of phenol in each phase per gram of virgin olive oil digested.	171
Table 9.1-2 2	Chromatographic and mass characteristics of hydroxytyrosol (1), tyrosol (2), p-coumaric acid (3), pinoresinol (4) and luteolin (5) and the metabolites (M) formed after incubation using differentiated Caco-2/Tc7 cells monolayer as a model of the human intestinal epithelium.	176
Table 9.1-2 3	Amounts of various phenols and their metabolites (expressed as nmols/2 ml culture media) in cell culture media and cells after the incubation at different concentrations in the culture media (40 $\mu$ M= 80 nmols; 100 $\mu$ M= 200 nmols; 50 $\mu$ M= 100 nmols) and incubation periods, using differentiated Caco2/Tc7 cell monolayers as a model of the human small intestinal epithelium. The metabolism yield is expressed as percentage of the nmols transformed of each phenol.	181

<b>Table 9.1-2 4</b>	Transport profile of individual phenol metabolites in CaCo-2/TC7 cell monolayers after different incubation periods (1, 6 and 24 hours). A '-' indicates not detected while the number of '+' indicates the relative transport rate (+, relatively slow; ++, relatively fast) for phenols and their metabolites in the apical, cellular and basolateral compartments after apical loading of the phenol at 100 $\mu$ M	<b>184</b>
----------------------	--	------------

TABLAS	<b>CAPÍTULO III: 9.3</b>	Página
<b>Table 9.3 1</b>	Characteristics of the human volunteers' and plasma biochemical parameters after a 12 h overnight fasting period.	<b>194</b>
<b>Table 9.3 2</b>	Composition diets of the volunteers of the study.	<b>195</b>
<b>Table 9.3 3</b>	Retention time, mass spectral characteristics of chromatographic peaks of the fasting plasma phenolic extracts by UPLC-ESI-MS/MS in negative ESI (-) mode. Concentration of phenols in human plasma of consumers and non-consumers of virgin olive oil	<b>199</b>
<b>Table 9.3 4</b>	Retention time, mass spectral characteristics of chromatographic peaks of the fasting plasma phenolic extracts by UPLC-ESI-MS/MS in negative ESI (+) mode. Concentration of phenols in human plasma of consumers and non-consumers of virgin olive oil	<b>200</b>

TABLAS	<b>CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GLOBAL</b>	Página
<b>Tabla D 1</b>	Clasificación de los diferentes compuestos fenólicos en función su actividad antioxidante en los distintos modelos.	<b>216</b>
<b>Tabla D 2</b>	Resumen de las características moleculares de cada compuesto fenólico determinantes de su capacidad antioxidante	<b>217</b>
<b>Tabla D 3</b>	Prolongación de la etapa de latencia de las LDL después de incubarse junto con 2 $\mu$ M de los diferentes compuestos fenólicos de manera individual y en las diferentes combinaciones entre ellos: Valores observados y valores esperados para las diferentes combinaciones.	<b>228</b>
<b>Tabla D 4</b>	Resumen de los resultados de la digestión <i>in vitro</i> del aceite de oliva. Los balances negativos indican "generación" durante la digestión.	<b>234</b>
<b>Tabla D 5</b>	Metabolitos identificados después del periodo de incubación	<b>239</b>



### **3. ÍNDICE DE FIGURAS**





FIGURAS	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	Página
<b>Figura I 1</b>	Estructura de los principales ácidos fenólicos y derivados de la oliva y del aceite de oliva. Ácido benzoico, (II) Ácido p-hidroxibenzoico, (III) Ácido vainílico, (IV) Ácido protocatéquico, (V) Ácido siríngico, (VI) Ácido gálico, (VII) Ácido sinápico, (VIII) Ácido p-cumárico, (IX) Ácido o-cumárico, (X) Ácido cafeico, (XI) Ácido ferúlico. (A) Verbascósido, (B) Vainillina.	48
<b>Figura I 2</b>	Estructura de los principales compuestos fenólicos secoiridoides glucosilados presentes en oliva. (I) Oleuropeína, (II) Ligustrósido, (III) Demetiloleuropeína.	49
<b>Figura I 3</b>	Estructura de los principales fenoles simples y derivados secoiridoides. (A) Tirosol o p- HPEA, (B) Hidroxitirosol o 3,4-DHPEA. Formas aldehídicas: (I) p-HPEA-EA, (II) 3,4-DHPEA-EA. Formas dialdehídicas: (III) p-HPEA-EDA, (IV) 3,4-DHPEA-EDA. (V) Forma dialdehídica de la oleuropeína aglicona, (VI) Forma dialdehídica del ligustrósido aglicona	50
<b>Figura I 4</b>	Estructura de los flavonoides mayoritarios del aceite de oliva	51
<b>Figura I 5</b>	Estructura de los lignanos presentes en aceite. (A) (+) - 1-acetoxipinoresinol, (B) (+) - 1Pinoresinol.	52
<b>Figura I 6</b>	Estructuras básicas dentro de la familia de flavonoides	55
<b>Figura I 7</b>	Mecanismo de quelación de metales desarrollado por flavonas y flavononas propuesto por Hudson y Lewis ( <i>Hudson y col., 1983</i> )	56
<b>Figura I 8</b>	Proceso de absorción, transporte y eliminación de los polifenoles consumidos en la dieta a través de los diferentes órganos corporales humanos implicados. Adaptado de Bokkenheuser (1987)	67
<b>Figura I 9</b>	Esquema para la predicción de la absorción de los polifenoles en humanos. Adaptado de Scalbert (2000)	68
<b>Figura I 10</b>	Esquema simplificado que muestra el metabolismo de los polifenoles. CBG: $\beta$ -glucosidasa citosólica; LPH: lactato florizina hidrolasa; COMT: catecol-O-metil-transferasa; UDPGT: UDP glucuronosil transferasa; SULT: sulfotransferasa. Adaptado de Scalbert (2000)	71
<b>Figura I 11</b>	Estructura de la LDL	77
<b>Figura I 12</b>	Representación esquemática de la conversión de la LDL nativa en LDL oxidada y los cambios físicoquímicos que acompañan dicha oxidación [1].	81

FIGURAS	CAPÍTULO II: 8.1	Página
Figure 8.1 1	Structures of phenolic compounds used in the study	127
Figure 8.1 2	Concentrations of the different olive oil phenols (luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropin, 3,4-DHPEA-EDA, galic acid, acetoxypinoresinol, luteolin-7-O-glucoside, p-HPEA-EDA, caffeic acid, vanilin, 3,4-DHPEA-AC, pinoresinol, p-coumaric acid, tyrosol, apigenin, verbascoside, apigenin-7-O-glucoside, ferulic acid) required for the inhibition of the LDL lag phase (in minutes). Each compound was tested in the range of 0 to 20 $\mu$ M; $\alpha$ -tocopherol at a concentration of 0.5 $\mu$ M was used as control.	130
Figure 8.1 3	Prolongation of the lag phase of LDL following incubation with olive oil phenols (0.5 $\mu$ M), luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropin, 3,4-DHPEA-EDA, galic acid, acetoxypinoresinol, luteolin-7-O-glucoside, p-HPEA-EDA, caffeic acid, vanilin, 3,4-DHPEA-AC, pinoresinol, p-coumaric acid, tyrosol, apigenin, verbascoside, apigenin-7-O-glucoside, ferulic acid, and $\alpha$ -tocopherol. The values are relative to control LDL. Results are expressed as in minutes (mean $\pm$ SEM) increased with respect to control LDL. * Mean significant different from control LDL $p < 0.05$ by Bonferroni test. Measurements were performed in triplicate.	131
Figure 8.1 4	Phenol compounds concentrations ( $\mu$ M) in post-prandial human plasma (240 min) following the oral intake of a single bolus of 40 ml of VOO.	134

FIGURAS	CAPÍTULO II: 8.2	Página
Figure 8.2 1	Structures of olive-derived polyphenols used in this study	143
Figure 8.2 2	Olive-derived polyphenols inhibit protein oxidation in oxLDL to varying degrees. A. Representative western-blot of the screening phase for LDL apoprotein protection in oxLDL. Data are presented for 3,4-DHPEA-AC, apigenin, rutin, <i>p</i> -cumaric acid and apigenin-7-O-glucoside at 100 $\mu$ M. Veh: Vehicle, * indicates Apo B-100 molecular weight and arrow indicates protein fragmentation induced by oxidation. B: Effect of olive-derived polyphenols in protein carbonylation in $\text{Cu}^{++}$ -incubated LDL. All phenols were tested at three concentrations (5 $\mu$ M, 50 $\mu$ M and 100 $\mu$ M). LDL and $\text{Cu}^{++}$ incubated LDL were used as control of native and oxidized LDL. The antioxidant capacity of each phenol at different concentrations is expressed as percentual values, considering that the immunoreactivity of $\text{Cu}^{++}$ -incubated LDL is considered 0 % of antioxidant capacity -positive values reveal decreased carbonyl formation and negative values reveal increased protein carbonylation-. Data shown are mean $\pm$ S.D., (n=4 for each data point).	148

- Figure 8.2 3** Proteins from Cu<sup>++</sup>-incubated LDL show significant increases in the amounts of oxidation markers whose formation is inhibited by selected olive-derived polyphenols. A-C show GC/MS analyses of GSA and AASA (markers of metal-catalyzed oxidation), and MDAL, originated from lipoxidation. Values shown are % changes of mean  $\pm$  S.E.M. over values from control LDL (GSA: 5945 $\pm$ 61  $\mu$ mol/mol lysine; AASA: 1128 $\pm$ 20  $\mu$ mol/mol lysine; and MDAL: 177 $\pm$ 23  $\mu$ mol/mol lysine); \*p<0,05; \*\* p<0,01 and \*\*\* p<0,001 respect to Cu<sup>++</sup> incubated LDL. D: protein lipoxidative damage shows a quadratic relationship with peroxidizability index (PI) ( $r^2=0,911$ ; p<0,0001; model:[MDAL] = 1,03\*[PI]<sup>2</sup>-151,26\*[PI]+5698) **150**
- Figure 8.2 4** Olive-derived polyphenols inhibit changes in LDL lipidome induced by Cu<sup>++</sup>. A: Pie plot showing distribution of differential lipid species between control and Cu<sup>++</sup>-incubated LDL. B: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of PLPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. C: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of SGPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. D: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of POVPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. E: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of PGPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. Values shown are mean  $\pm$  S.E.M over values from Cu<sup>++</sup>-incubated LDL, \*\*\* p<0,001 (n=4 for each data point). **153**
- Figure 8.2 5** Olive-derived polyphenols inhibit to various extents oxidative-stress induced loss of viability in endothelial and hepatocyte cell-lines. A: Effect of olive-derived polyphenols in cell death in HMEC (endothelial cell line) induced by Cu<sup>++</sup>-incubated LDL; \*\* p<0,01 and \*\*\* p<0,001 respect to cell death induced by Cu<sup>++</sup> incubated LDL (n=6 for each data point). Values shown are mean  $\pm$  S.E.M. over values from samples treated with control LDL B: Effect of olive-derived polyphenols in HepG2 capacity to withstand t-BOOH induced cell death; \*\*\* p<0,001 respect to cell death induced by t-BOOH (n=6 for each data point). Values shown are % changes of mean  $\pm$  S.E. over values from control samples. C: Endothelial cell death induced by Cu<sup>++</sup>-incubated LDL is strongly correlated with GSA content ( $r=-0.734$ ; p<0,016 by the Pearson correlation test) **154**

FIGURAS	CAPÍTULO III: 9.1 Y 9.2	Página
Figure 9.1-2 1	Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectrums of the native form of hydroxytyrosol and the generated metabolites: hydroxytyrosol-sulfate (M1), hydroxytyrosol-methyl-sulfate (M2) and hydroxytyrosol-methyl (M3).	174
Figure 9.1-2 2	Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectrums of the native form of tyrosol and the generated metabolites: tyrosol-methyl (M4) and tyrosol-sulfate (M5).	175
Figure 9.1-2 3	Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectrums of the native form of <i>p</i> -coumaric acid and the generated metabolites: <i>p</i> -coumaric acid-disulfate (M6) and <i>p</i> -coumaric acid-methyl (M7).	177
Figure 9.1-2 4	Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectrums of the native form of pinoresinol and the generated metabolites: pinoresinol-sulfate (M8) and pinoresinol-glucuronide (M9).	178
Figure 9.1-2 5	Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectrums of the native form of luteolin and the generated metabolites: luteolin-glucuronide (M10), luteolin-methyl (M11) and luteolin-methyl-glucuronide (M12).	179

FIGURAS	CAPÍTULO III: 9.3	Página
Figure 9.3 1	Chromatographic profile of phenolic metabolites in the fasting human plasma of regular VOO consumers and non-consumers.	198

	CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GLOBAL	Página
Figura D 1	Esquema de las etapas de oxidación de las distintas estructuras que conforman las LDL	212
Figura D 2	Hidroxitirosol y tirosol	219
Figura D 3	Estructuras químicas de los ácidos fenólicos.	220
Figura D 4	Estructura básica de los flavonoides	221
Figura D 5	Estructura química de las formas dialdehídicas.	222
Figura D 6	Estructura del 4-acetoxietil-1,2-dihidroxibenceno (3,4-DHPEA-AC)	223
Figura D 7	Estructura química de la oleuropeina	223
Figura D 8	Estructura de los lignanos mas abundantes en el aceite de oliva virgen.	224
Figura D 9	Estructura química del verbascosido	225
Figura D 10	Esquema del posible metabolismo de fenoles del aceite de oliva (Fuente: Vissers y col., 2002).	237
Figura D 11	1 unidad de flujo = +; 2 unidades de flujo = ++; 0 unidades de flujo = -	242
Figura D 12	Ruta metabólica del hidroxitirosol	243

---

<b>Figura D 13</b>	Rutas de la biosíntesis y metabolismo de la catecolamina. DDC, dihydroxyphenylalanine decarboxylase; DBH, dopamine-hydroxylase; PNMT, phenylethanolamine <i>N</i> -methyltransferase; COMT, catechol- <i>O</i> -methyltransferase; MAO, monoamine oxidase	<b>247</b>
--------------------	---	------------

---





## **4. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**





#### 4.1 **EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN ¿ALIMENTO FUNCIONAL?**

A pesar de las diferentes teorías sobre el origen del aceite de oliva, la más aceptada defiende que el origen geográfico del olivo se encuentra en el Asia Menor, seis milenios antes de nuestra era. En la literatura clásica ha quedado reflejado su consumo por egipcios, griegos, romanos e israelíes en sus respectivos auges culturales. Se cree que su consumo se extendió a través de Chipre, al Mediterráneo Oriental, gracias a comerciantes fenicios, los mismos que lo llevarían a la Península Ibérica.

Sin embargo, la auténtica difusión del aceite de oliva se ha producido en nuestra época. El aceite de oliva es considerado la principal fuente de grasa vegetal de la “Dieta Mediterránea”. En las últimas décadas esta dieta se ha redescubierto como un modelo de alimentación capaz de mejorar la salud de los que la consumen y el aceite de oliva es una de las claves de ello. Los últimos estudios indican que el aceite de oliva es más que una grasa monoinsaturada, atribuyéndose a su contenido en determinados compuestos minoritarios una parte de los efectos beneficiosos sobre la salud. Esto es debido a que, a diferencia de otros aceites vegetales, el aceite de oliva se extrae sin el uso de disolventes y se consume sin refinar. Por tanto, se trata de un zumo extraído exclusivamente mediante tratamientos físicos [2, 3] que conserva una importante cantidad de componentes minoritarios, presentes en el fruto de la oliva, de gran interés. Sin embargo, existen diferentes calidades dentro de los aceites de oliva. Es la categoría **virgen extra** la única con un porcentaje elevado de los componentes minoritarios y por tanto la de mayor interés nutricional.

Conociendo esto, **¿podría el aceite de oliva ser un alimento funcional?** La definición de “alimento funcional” todavía no es definitiva. Por el momento, se consideran dentro de este grupo los alimentos que de forma natural o procesada, contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos en una o varias funciones del organismo y que se traducen en una mejora de la salud o en una disminución de sufrir una enfermedad.

Para responder a esta pregunta es necesario demostrar científicamente que el aceite de oliva rico en compuestos fenólicos cumple esta definición. Tras esto, deberá superar los requisitos impuestos por la legislación vigente, para poder presentarse en el mercado como un **aceite de oliva funcional rico en compuestos fenólicos capaz de mejorar la dieta de sus consumidores y tener efectos cardioprotectores**. Sin embargo, esta legislación todavía no se ha redactado de forma definitiva, en el último punto de esta introducción se recoge el estado más actual de la normativa para alimentos funcionales.

##### 4.1.1 **COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA**

El aceite de oliva está formado mayoritariamente por triacilglicerol (98-99%). Además, contiene en muy baja proporción otras moléculas lipídicas, como los fosfolípidos y ácidos grasos libres; y numerosos compuestos de naturaleza química muy variada, como hidrocarburos, tocoferoles, alcoholes triterpénicos, esteroides, pigmentos, compuestos fenólicos y compuestos responsables del aroma pertenecientes al grupo de los aldehídos, alcoholes y ésteres, entre otros.

La mayor parte de los ácidos grasos están presentes como **triacilgliceroles**. *Graciani en 1988* [4] ya llevó a cabo un trabajo para caracterizar los principales aceites de oliva españoles, estableciendo valores medios típicos para los triacilgliceroles mayoritarios. Los triacilgliceroles mayoritarios en el aceite de oliva son la trioleína (OOO), la dioleopalmitina (POO) y la dioleolinoleína (OOL). La composición característica básica de los ácidos grasos que forman los triacilglicéridos del aceite de oliva muestra claramente el predominio del ácido oleico, aunque la variabilidad debida sobre todo a factores agroclimáticos es muy elevada (**Tabla I 1**). Pese a esta variabilidad, tan solo una proporción muy baja de ácidos grasos saturados (<1,3%) ocupa la posición 2 del triglicerido. Por ello, la fracción de triacilglicéridos es utilizada como un criterio de pureza, para diferenciar el aceite de oliva de otros tipos de aceite.

**Tabla I 1.** Composición característica básica de los ácidos grasos mayoritarios del aceite de oliva.

Ácidos grasos	Límites (%)
Palmítico	C <sub>16:0</sub> 7,5 - 20,0
Palmitoleico	C <sub>16:1</sub> 0,3 - 3,5
Estearico	C <sub>18:0</sub> 0,5 - 5,0
Oleico	C <sub>18:1</sub> 55,0 - 83,0
Linoleico	C <sub>18:2</sub> 3,5 - 21,0
Linolénico	C <sub>18:3</sub> ≤ 1,0

Fuente: *Consejo Oleícola Internacional (IOOC) 2003.*

Estos rangos varían dependiendo de la latitud y las condiciones edafoclimáticas de la zona de cultivo del olivo, así como de la variedad y el grado de madurez de las aceitunas [5-7]. A pesar de esta variabilidad, la legislación mantiene unos valores máximos para determinados ácidos grasos minoritarios como el mirístico, linolénico, araquídico, eicosenoico, behénico y lignocérico.

La **fracción minoritaria no glicérida** representa únicamente un 1-2 % del aceite. A pesar de su baja concentración, algunos de los constituyentes de la fracción minoritaria son determinantes a la hora de evaluar la estabilidad oxidativa, las características organolépticas como el aroma y el sabor y la calidad nutricional del aceite. Además, su análisis cuantitativo puede contribuir de forma importante a la autenticación de los diversos tipos de aceites de oliva e incluso a la detección de adulteraciones. En la **Tabla I 2** se presenta un resumen de los componentes minoritarios del aceite de oliva.

**Tabla I 2.** Componentes de la fracción minoritaria no glicérida del aceite de oliva.

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad o proporción</b>
<b>Terpenos:</b>	
Escualeno	300 - 700 mg/100 g
Carotenos	0,5 - 10 mg/ kg (expresado como $\beta$ -caroteno)
<b>Clorofilas</b>	0 a 9,7 mg/kg
<b>Tocoferoles:</b>	
$\alpha$ -tocoferol	7 - 30 mg/100 g > 93 %
$\beta$ y $\gamma$ -tocoferol	< 10 % del total de tocoferoles
$\delta$ -tocoferol	< 1,5 %
<b>Esteroles:</b>	
campesterol	80 - 240 mg/100g 2,0 - 3,0 %
stigmasterol	1,0 - 2,0 %
$\gamma$ -sitosterol + $\Delta 5$ avenasterol	95,0 - 97,0 %
<b>Compuestos fenólicos</b>	50 - 500 mg/kg (expresado como ácido cafeico)
<b>Otros:</b> Alcoholes, cetonas, éteres, ésteres y derivados furánicos.	

Fuente: Mataix y Martínez de Victoria, 1988.[8]

## 4.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos, denominados a veces impropriamente polifenoles, son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (J.B. Harborne y col., 1989)[9]. Estos compuestos están distribuidos en todo el reino vegetal, siendo la forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Los azúcares pueden ser tanto monosacáridos como disacáridos o incluso oligosacáridos. Los más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico. En ocasiones, pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos [10].

### 4.2.1 CLASIFICACIÓN

Se han llegado a identificar más de 8.000 compuestos fenólicos con estructura muy variada, por lo que su clasificación es una tarea compleja. Una de las más utilizadas es la enunciada por Harborne y col. (1989)[9], que agrupa los fenoles en diez clases, dependiendo de su estructura química básica. La clasificación se muestra en la **Tabla I 3**.

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Cada una de las familias agrupa un número de compuestos fenólicos más o menos variado, siendo la familia de los flavonoides, con cerca de 4.000 estructuras diferentes una de las más estudiadas.

La presencia de fenoles en las plantas es muy variada, dependiendo de la especie vegetal, variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), condiciones agroclimáticas del cultivo, así como aspectos tecnológicos relacionados con el procesado y conservación de los productos que los contienen.

**Tabla I 3:** Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica enunciada por Harborne.

NUMERO DE ÁTOMOS DE CARBONO	DE ESQUELETO	CLASE
6	C <sub>6</sub>	Fenoles Simples, Benzoquinonas
7	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>	Acidos Fenolicos
8	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>	Acetofenona, Acido Fenilacético
9	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	Acidohidroxicinamico, Cromonas, Coumarinas, Isocoumarinas, Polipropenos
10	C <sub>6</sub> - C <sub>4</sub>	Naftoquinonas
13	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub>	Xantonas
14	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub>	Estilbenos, Antraquinonas
15	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub>	Flavonoides, Isoflavonoides
18	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanosen, Neolignanosen
30	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoides
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas
	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Catecolmelanina
	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	(Taninos Condensados)

Fuente: Harborne , 1989[9]

#### 4.2.2 FUNCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La posible funcionalidad de los compuestos fenólicos en las plantas ha sido a lo largo de los años un tema complejo. Ya en 1917, M. Wheldale [11] escribió un libro sobre el papel de los antocianos en las plantas. Esta investigadora había observado que los antocianos de las plantas tenían numerosos efectos protectores, tales como favorecer el camuflaje e incluso atraer insectos contribuyendo de esta manera a la polinización..., pero las explicaciones que demostraban una funcionalidad en una determinada planta presentaban numerosas excepciones que quedaban sin explicación en otras plantas. Actualmente una de las explicaciones más aceptadas a la síntesis de fenoles en las plantas es como respuesta al estrés. Las plantas están casi de forma continua sometidas a un estrés ambiental debido a radiaciones UV, altas temperaturas particularmente en zonas de clima mediterráneo, baja disponibilidad de agua, plagas, etc. Existen estudios que demuestran como las plantas sintetizan compuestos fenólicos para portegerse de los herbívoros (insectos o vertebrados)[12-15] o de las radiaciones UV u otras situaciones de estrés físico[15-17]. Otro papel a parte de este es el ser atrayentes de animales polinizadores y/o diseminadores de semillas[9, 15], el actuar como señales químicas entre plantas y microorganismos simbióticos [18, 19] y el ejercer una función estructural, por el efecto de las ligninas en el soporte mecánico de las plantas [15].

Pero los compuestos fenólicos no sólo son importantes para la planta, también tienen consecuencias para los animales y humanos, ya que los incorporamos a nuestro organismo con el consumo de alimentos de origen vegetal.

El estudio de los compuestos fenólicos en alimentación se ha centrado en varios aspectos; por una parte, en la contribución a las propiedades organolépticas como el color y el amargor. Por ejemplo, la elevada concentración de derivados de oleuropeína en el aceite de oliva virgen potencia los atributos amargo y picante [20]. Por otra parte, en la participación en los procesos de oxidación durante la producción y conservación. Así, los aceites de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos están especialmente protegidos de la oxidación.

Sin embargo, la principal razón que ha hecho que el estudio de los compuestos fenólicos haya sido objeto de numerosas investigaciones en los últimos 15 años es su contribución a la mejora de la salud. En los últimos años se han acumulado evidencias de que algunos compuestos fenólicos ingeridos con la dieta habitual pueden tener implicaciones sobre la salud humana, concretamente en la reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales del ámbito de la nutrición, como la OMS, la CIIC o la AAR, recomiendan un consumo diario de antioxidantes, principalmente a través de frutas y verduras, con el fin de prevenir o atenuar patologías asociadas al estrés oxidativo celular [21-25]. Dentro de este grupo de antioxidantes se encontrarían carotenoides, licopenos, Vitamina C, Zinc, Selenio, etc. además de los compuestos fenólicos.

### 4.2.3 FRACCIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA

Los compuestos fenólicos forman parte de la fracción minoritaria del aceite de oliva. La pulpa del fruto de la oliva contiene elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, entre 20 y 50 g/kg, aunque tan sólo una pequeña parte pasan al aceite durante el proceso de extracción [26]. El hecho de que su concentración en el aceite sea mucho más baja que en el fruto es consecuencia de su naturaleza hidrosoluble, lo que hace que la mayor parte de los compuestos fenólicos queden retenidos en las aguas de vegetación del fruto y en el agua adicionada durante el proceso. Sin embargo, pese a su baja concentración en el aceite de oliva su importancia es destacable. En los años 70 se publicaron los primeros trabajos en los que se asoció la estabilidad a la autooxidación de los aceites de oliva con el elevado contenido de compuestos fenólicos [27], y estudios posteriores confirmaron su implicación en los atributos amargo y picante del aceite de oliva virgen [20, 28].

La identificación de los compuestos fenólicos del aceite se inició en los años 70 aplicando técnicas cromatográficas de la época, con muchas limitaciones para la cuantificación e identificación, como las cromatografías en columna y de capa fina. En estos primeros estudios se identificaron tirosol e hidroxitirosol, así como los flavonoides luteolina y apigenina y algunos ácidos fenólicos [29-32]. Fue a partir de los años 90, con el desarrollo de las técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear, cuando se iniciaron investigaciones para alcanzar un mejor conocimiento de la composición de la fracción fenólica de olivas y aceite, destacando en

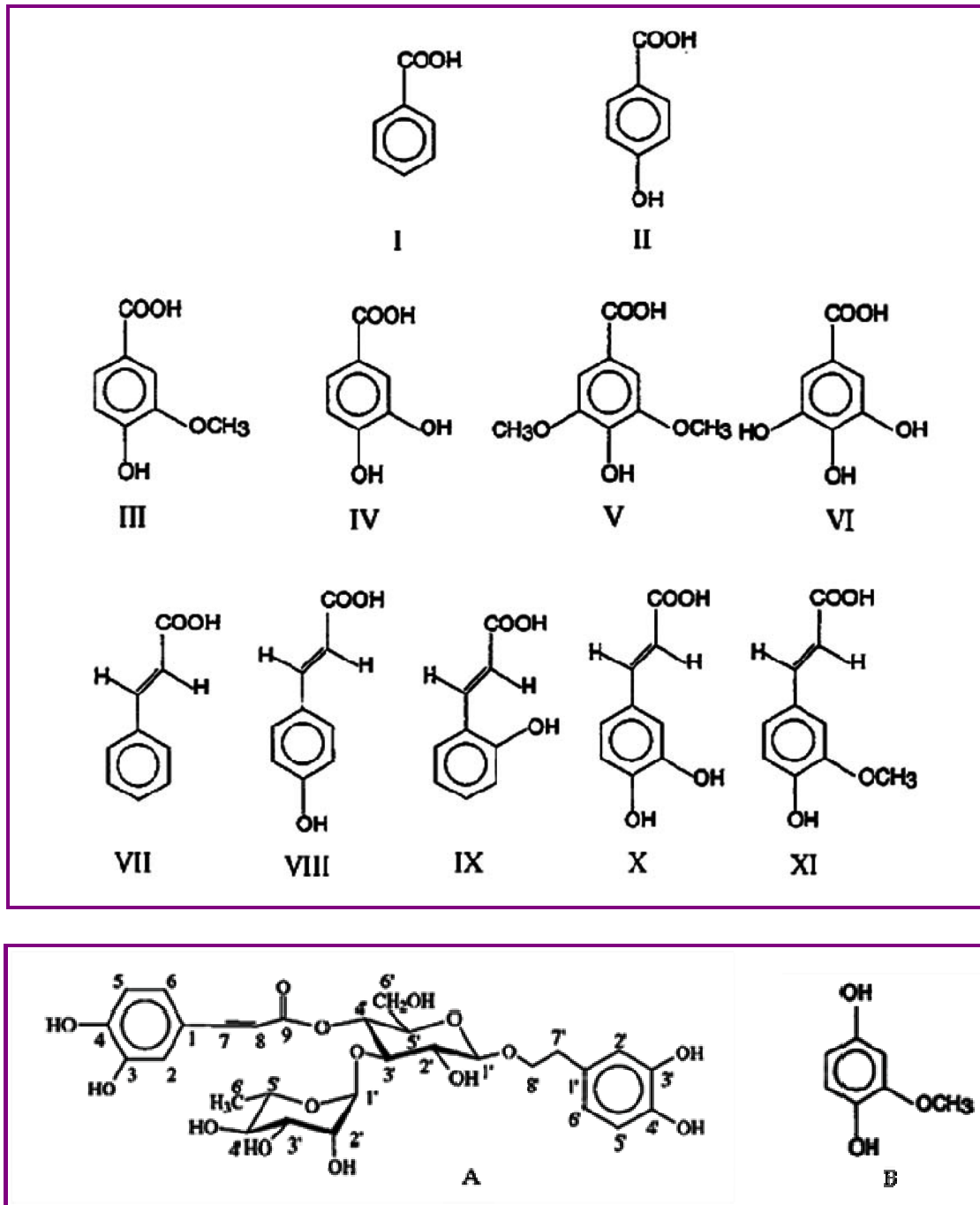
particular los trabajos de la Universidad de Perugia (Italia), en los que se identificaron las estructuras de los derivados secoiridoides mayoritarios del aceite de oliva [33-36]. Los secoiridoides son compuestos derivados de la oleuropeína y el ligustrósido, que son los fenoles mayoritarios del fruto. Posteriormente se amplió el conocimiento de la fracción fenólica con la identificación de nuevos compuestos como los lignanos [37, 38]. La identificación completa de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen aún hoy en día permanece incompleta.

Pese a su complejidad, no existen diferencias cualitativas en el perfil fenólico en relación con la variedad de oliva y/o la zona de cultivo [39-42]. Sin embargo existen diferencias cuantitativas que han sido propuestas por algunos autores como marcadores de variedad y origen [39-42]. Los principales factores que contribuyen a la distribución cuantitativa y cualitativa de los compuestos fenólicos en oliva y por consiguiente en aceite de oliva son de carácter agronómico y tecnológico. Como principales factores agronómicos destacan la variedad, los factores ambientales (climatología y tipo de suelo), las prácticas culturales (riego, tratamientos fitosanitarios, sistema de recolección), así como el periodo de recolección [5, 36, 43-46]. Como principales factores tecnológicos destacan el tiempo y condiciones de almacenamiento de la oliva antes de su procesado, el sistema de extracción y las condiciones de conservación del aceite [33, 47-50].

Los principales fenoles del aceite de oliva virgen pertenecen a las familias de los **ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, secoiridoides y lignanos** [3, 34].

- **Ácidos fenólicos y derivados.**

Los ácidos fenólicos según su estructura se clasifican en derivados del ácido benzoico ( $C_6-C_1$ ) o del ácido cinámico ( $C_6-C_3$ ). Ya se ha mencionado que fueron los primeros fenoles identificados en el aceite de oliva virgen. Representan una fracción minoritaria. Dentro de este grupo se han identificado el ácido cafeíco, ácido vainillico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido protocatequico, ácido sinápico, ácido gallico, ácido benzoico y ácido p-hidroxibenzoico [33, 51-56]. En la **Figura I 1** se detallan las estructuras de los principales ácidos fenólicos y derivados del aceite y de la oliva.



**Figura I 1.** Estructura de los principales ácidos fenólicos y derivados de la oliva y del aceite de oliva. Ácido benzoico, (II) Ácido p-hidroxibenzoico, (III) Ácido vainílico, (IV) Ácido protocatéquico, (V) Ácido siríngico, (VI) Ácido gálico, (VII) Ácido sinápico, (VII)Ácido p-cumárico, (VIII)Ácido o-cumárico, (IX)Ácido cafeico, (XI)Ácido ferúlico. (A)Verbascósido, (B) Vainillina.



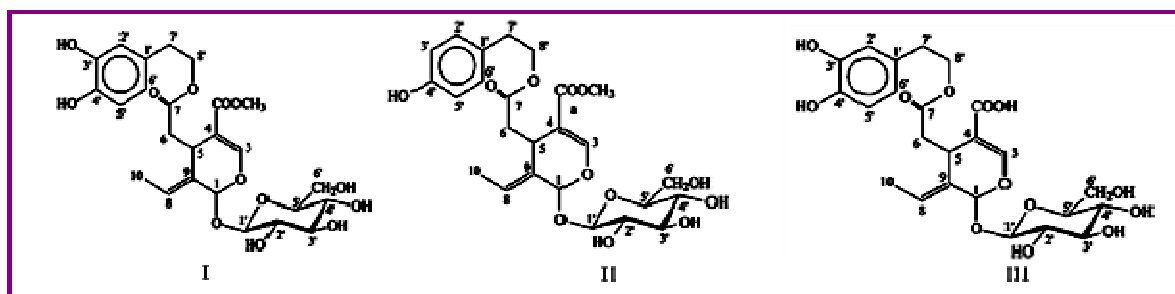
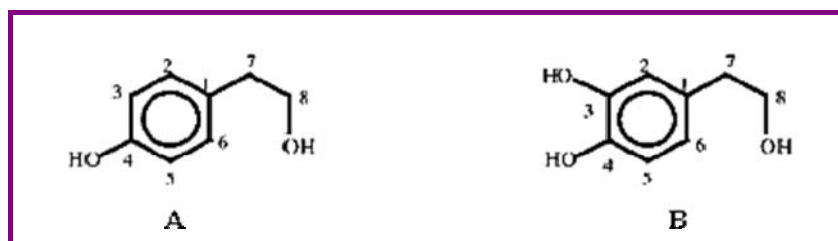


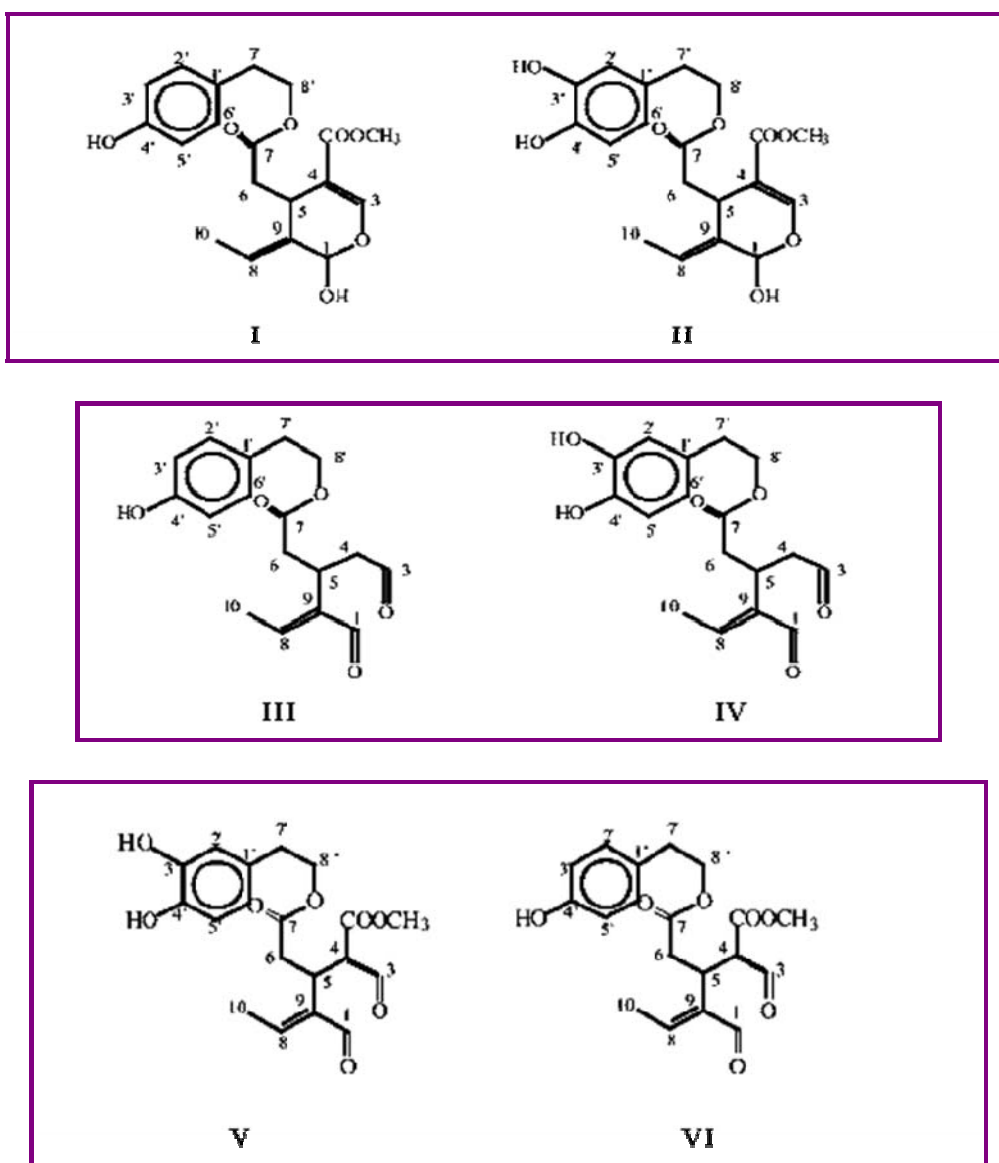
Figura I 2. Estructura de los principales compuestos fenólicos secoiridoides glucosilados presentes en oliva. (I) Oleuropeína, (II) Ligustrósido, (III) Demetiloleuropeína

- **Secoiridoides:** Bajo la denominación de iridoides se agrupan una serie de monoterpenos bicíclicos (C10) derivados biosintéticamente del monoterpeno geraniol, que presentan como estructura básica común un ciclopentapirano denominado iridano, por haberse detectado la primera vez en unas hormigas pertenecientes al género *Iridomirmex*. Estos compuestos pueden encontrarse como estructuras abiertas (secoiridoides) o cerradas (iridoides) generalmente en forma heterosídica, mayoritariamente como glucósidos.

La oliva contiene compuestos secoiridoides en forma libre y glucosilados, siendo la oleuropeína el mayoritario. Además también contiene ligustrósido y algunas variedades como la demetiloleuropeína. A este grupo fenólico se les atribuye el amargor característico del fruto verde (Figura I 2).

Durante el proceso de extracción del aceite de oliva se producen modificaciones en la estructura química de los secoiridoides del fruto, dando lugar a agliconas con estructuras diversas. Montedoro y col. (1992 y 1993)[33, 34, 36] propusieron la estructura de algunos de los derivados secoiridoides mayoritarios (Figura I 3), que con posterioridad ha sido confirmada por numerosos investigadores mediante técnicas instrumentales avanzadas [34, 36, 37, 55, 57]. El derivado secoiridoide mayoritario en el aceite de oliva es la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA). También está presente la forma dialdehídica derivada del ligustrósido (p-HPEA-EDA), comúnmente denominada *oleocantal*, recientemente descrita como importante molécula con actividad antiinflamatoria. Además de estos dos compuestos fenólicos mayoritarios, en el aceite de oliva se han identificado otros derivados secoiridoides como la forma aldehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EA), isómero de la oleuropeína aglicona, y la forma aldehídica del ácido elenólico unida al tirosol (p-HPEA-EA), isómero del ligustrósido aglicona.





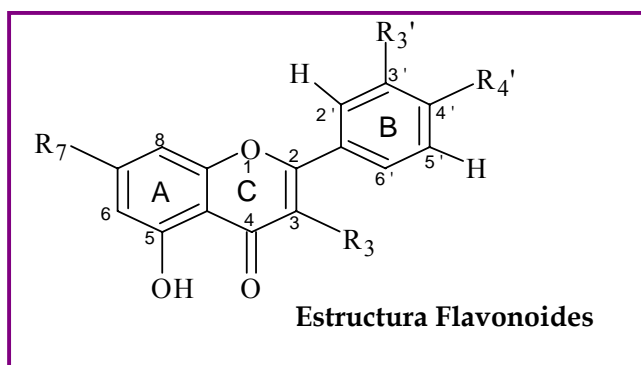
**Figura I 3.** Estructura de los principales fenoles simples y derivados secoiridoides. (A) Tirozol o p-HPEA, (B) Hidroxitirozol o 3,4-DHPEA. Formas aldehídicas: (I) p-HPEA-EA, (II) 3,4-DHPEA-EA. Formas dialdehídicas: (III) p-HPEA-EDA, (IV) 3,4-DHPEA-EDA. (V) Forma dialdehídica de la oleuropeína aglicona, (VI) Forma dialdehídica del ligustrósido aglicona.

Durante el proceso de extracción del aceite de oliva virgen la hidrólisis de los derivados secoiridoides da origen a sus formas más simples como el hidroxitirozol o 2-(3,4)-dihidroxifenil etanol (3,4-DHPEA) y el tirozol o 2-(4-hidroxifenil etanol) (p-HPEA)[34]. También están presentes compuestos que los contienen en sus estructura, tales como el hidroxitirozol acetato[58], el 4-acetoxietil-1,2-dihidroxibenceno (3,4-DHPEA-AC) [58], el tirozol acetato [59] y la forma glicosilada del hidroxitirozol [60].

En la actualidad todavía hay componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen que se mantienen sin identificar. La aplicación de técnicas analíticas, como el acoplamiento a los sistemas de cromatografía de detectores de masas en tándem, ha permitido confirmar la complejidad de la fracción de los derivados secoiridoides, habiéndose detectado numerosas estructuras isómeras de algunos compuestos que hacen muy compleja la cuantificación por técnicas de detección clásicas como la fluorimetría o los fotodiodos. *Caruso et al., 2000*[61] y *Visioli et al., (2002)* [62] ya señalaron el problema a la hora de cuantificar la oleuropeína aglicona y proponen el uso de la espectrometría de masas/masas como una de las técnicas para identificar los picos correspondientes a los diferentes isómeros. De forma similar *Vissers et al. (2002)*, [63] señala la existencia de hasta 10 estructuras isoméricas de la oleuropeína aglicona. Probablemente, la necesidad de técnicas de detección complejas sea la causa de que en numerosos artículos científicos recientes se identifiquen como derivado de la oleuropeína o del ligustrósido bastantes compuestos, sin llegar a dilucidar la estructura. *De la Torre y col. (2005)* [64] han llegado a asignar estructura de derivado secoiridoide a 23 compuestos fenólicos de un extracto de aceite de oliva.

- **Flavonoides:**

Los flavonoides del aceite de oliva que fueron identificados en primer lugar son las flavonas luteolina y apigenina, presentes en forma libre y glicosiladas[65]. Las formas glicosiladas aparecen principalmete en el fruto, mientras que las formas mayoritarias en el aceite son las libres. Su estructura se detalla en la **Figura I 4**. Recientemente se ha encontrado en un aceite de oliva español el (+)-taxifolin [56].



Compuestos	R7	R3	R3'	R4'
Apigenina	OH	H	H	OH
Apigenina-7-Glucósido	Glc	H	H	OH
Luteolina	OH	H	OH	OH
Luteolina -7-Glucósido	Glc	H	OH	OH

**Figura I 4.** Estructura de los flavonoides mayoritarios del aceite de oliva.

- **Lignan:**

Son un grupo de dímeros de fenilpropanoide unidos mediante un enlace 8-8'. Están estructuralmente relacionados con la lignina, formando en algunos casos parte de ella [66]. Inicialmente fueron detectados dos epoxilignanos, el (+) 1-acetoxipinoresinol, (+) pinoresinol. Con posterioridad se identificó en el aceite de oliva virgen el (1)- hidroxipinoresinol [37, 38] (Figura I 5).

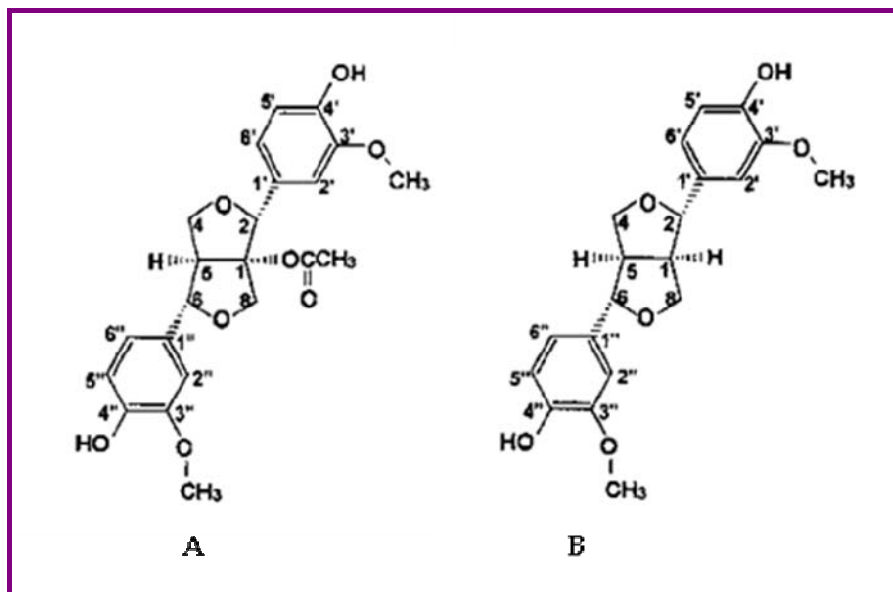


Figura I 5. Estructura de los lignanos presentes en aceite. (A) (+) - 1- acetoxipinoresinol, (B) (+) - 1Pinoresinol.

- **Hidroxiisocromos:** esta es una nueva clase de fenoles, que se ha determinado en distintas muestras de aceite de oliva virgen, destacamos el 1-fenil-6,7,dihidroxiisocromo y el 1(3' metoxi1' hidroxifenil 6,7 dihidroxiisocromo [67].

- **Otros Compuestos:**

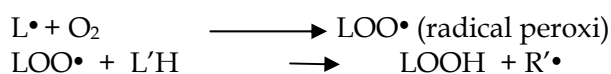
También se encuentran en el aceite de oliva otros compuestos no pertenecientes a las familias descritas anteriormente, tales como el aldehído fenólico vainillina, y el verbascósido, un heterósido del ácido cafeico y el hidroxitirosol cuya presencia en el aceite fue confirmada por *Servili y col en 1999.[68]*

### 4.3 FENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los mecanismos de acción y particularidades por los que los fenoles presentan actividad antioxidante son diversos. Cada fenol actuará por uno o más mecanismos, según sus propiedades características. La explicación química de estos mecanismos tan sólo se conoce para determinados grupos de fenoles. Algunos de los mecanismos que han sido dilucidados son los siguientes[69] :

- Prevenir la iniciación de la cadena de reacciones de oxidación mediante combinación con los radicales iniciadores, tales como los radicales hidroxilo[70-72]. Los ácidos y alcoholes fenólicos como el ácido cafeico o el hidroxitirosol presentan esta capacidad.
- Descomponer peróxidos al convertirlos en especies no radicales, tales como alcoholes [73]. Los ejemplos antes mencionados podrían también incluirse en este mecanismo.
- Actuación como secuestradores de radicales libres. Cada uno de los fenoles tienen distinta especificidad por las distintas especies oxidantes que se generan en el organismo.
- De forma indirecta, actuación como agentes quelantes de iones de metales de transición, ya que al unirse a ellos reducen la capacidad de éstos para generar radicales libres, mediante reacciones de Fenton [74]. Se han encontrado flavonoides con este tipo de actividad.
- Por su solubilidad pueden localizarse sobre las superficies de estructuras celulares, biomoléculas, etc., disminuyendo el consumo de antioxidantes propios de éstas, como pueden ser la vitamina E o los carotenoides, e incluso en algunos casos regenerando estos antioxidantes, una vez oxidados [75].
- Por su capacidad de inducir, inhibir, activar o proteger determinadas enzimas en el organismo. En este sentido, los distintos fenoles muestran alta especificidad, por ejemplo el hidroxitirosol, la oleuropeina, la luteolina y la apigenina inhiben la formación inductores de la agregación plaquetaria mediante la reducción del enzima 5-lipooxigenasa y la araquidonatodeshidrogenasa[15, 76].

A pesar de las dificultades, los mecanismos de protección antioxidante de algunas familias de compuestos fenólicos están bien caracterizados, como es el caso de los ácidos fenólicos y numerosos flavonoides. El mecanismo más conocido es el secuestro de radicales libres en los procesos de protección frente a la oxidación lipídica. Los lípidos pueden sufrir un proceso homolítico por acción del calor, radiaciones ionizantes o iones metálicos, entre otros, con formación de una especie radicalaria que en presencia de oxígeno forma radicales peroxi ( $\text{LOO}\cdot$ ), iniciándose una reacción en cadena con la formación de peróxidos y nuevos radicales peroxi por ataque del radical formado, a nuevas moléculas.

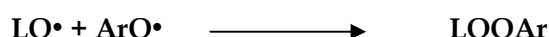


El papel del antioxidante de naturaleza fenólica (ArOH) es detener la cadena de oxidación al reaccionar con el radical peroxi formado. El mecanismo consta de las siguientes etapas:

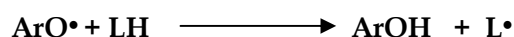
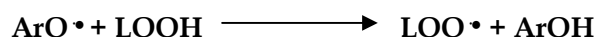
a) el radical peroxi (LOO•) se une al átomo de hidrógeno del antioxidante (ArOH), produciéndose un radical aroxil (ArO•) y un hidroperóxido.



b) radical aroxil reacciona con el peróxido mediante un acoplamiento entre radicales, formándose un producto no reactivo [73].



Pero debemos tener en cuenta, que el radical aroxil formado con la oxidación del antioxidante también puede reaccionar en algunos casos contribuyendo a la producción de nuevos radicales libres [73].



No obstante, también podría producirse una finalización de la reacción al reaccionar dos radicales aroxil, con lo que se rompería la cadena de la oxidación.



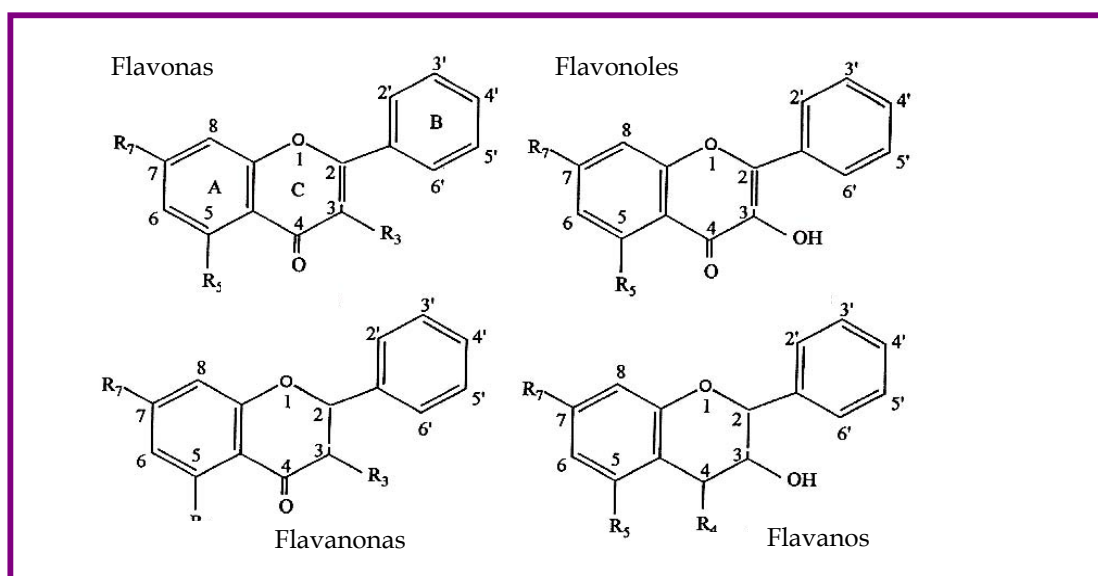
La influencia de la estructura química del compuesto fenólico ejerce una notable influencia en su actividad como antioxidante. Así, el impedimento estérico de algunos ácidos fenólicos, como el ácido cafeico, hace que se produzcan más frecuentemente las reacciones que dan productos no reactivos frente a las reacciones que dan radicales libres, por lo que globalmente se observa una inhibición de la oxidación lipídica. En general, los o-difenoles, como son el ácido cafeico, el hidroxitirosol y la oleuropeína, presentan una elevada capacidad antioxidante si los comparamos con ácidos fenólicos con menor impedimento estérico como es el tirosol [73], debido a la presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto, también llamado grupo catecólico.

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos con grupos OH y presencia de grupos carbonilos no unidos directamente al anillo bencénico, denominados ácidos de la serie cinámica, como son el ácido cafeico, el ácido ferúlico, el ácido sinápico y el ácido p-cumárico, son más activos que los derivados hidroxilo del ácido benzoico, como el p-hidroxibenzoico, ácido vainílico, ácido siríngico y ácido 3,4- dihidroxibenzoico [77].

Lo ideal, además, es que el radical libre antioxidante resultante, no inicie nuevos radicales libres, ni sea susceptible de una oxidación rápida por una reacción en cadena. En este sentido los antioxidantes fenólicos ocupan una posición privilegiada. Son excelentes donadores de

hidrógeno o electrones y sus intermedios radicalarios son relativamente estables, debido a la deslocalización por resonancia del electrón desapareado dentro del anillo aromático y a la carencia de posiciones adecuadas para el ataque por el oxígeno molecular[72, 78, 79].

También hay numerosas publicaciones acerca del mecanismo de actuación de flavonoides en los procesos oxidativos. Los flavonoides están formados por 3 anillos (A, B y C) (**Figura I 6**), cada uno de los cuales presenta distintos grados de hidroxilación y metilación y pueden aparecer como glucósidos o como agliconas. Además de comportarse como donadores de hidrógeno también actúan como agentes quelantes de iones metálicos iniciadores de la formación de radicales lipídicos.



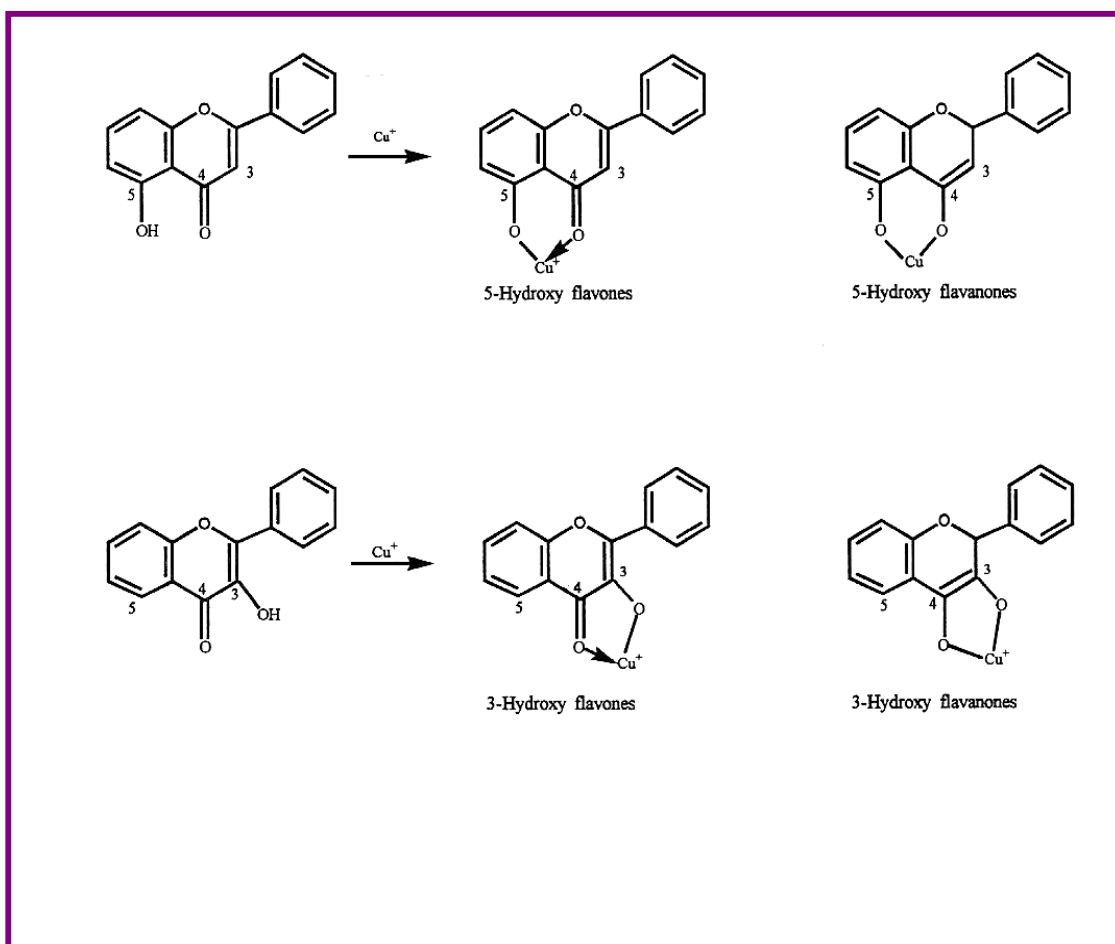
**Figura I 6.** Estructuras básicas dentro de la familia de flavonoides.

En el primer caso, la capacidad antioxidante de los flavonoides con sustituciones polihidroxiladas se ve afectada por la localización de la sustitución hidroxilo en el anillo B. Esta sustitución en posición 4' induce una menor actividad, pero si va acompañada con un grupo hidroxilo adicional en posición 3' ó 5', se observa una mejora importante. Un ejemplo es la mayor actividad antioxidante mostrada por la luteolina (4',5'-dihidroxi) frente a la de la apigenina (4'-hidroxi).

También el doble enlace en la posición 2 y 3 del anillo C (**Figura I 4**) de los flavonoles contribuye positivamente en mejorar la donación del hidrógeno. Por otro lado, se ha observado que la estructuras agliconas son más efectivas que sus correspondientes glicósidos, posiblemente debido a la falta de sustituciones 3-hidroxi libres en el anillo C(**Figura I 4**) [80, 81].

La capacidad para combinarse con metales también inhibe los procesos de degradación oxidativa. Esta acción se ve favorecida cuando el flavonoide tiene a) un grupo hidroxilo múltiple, siendo el 3',4'-dihidroxi, la configuración con más actividad, b) un grupo 4-carboxi y un grupo

3-hidroxi libre en contraposición a un 5-hidroxi y c) doble enlace C2=C3, un grupo OH en 3 y un grupo carboxi en C4 [74]. En la **figura I 7** se ha representado los mecanismos de quelación de los flavonoides.



**Figura I 7.** Mecanismo de quelación de metales desarrollado por flavonas y flavononas propuesto por Hudson y Lewis [74] (Hudson y col., 1983)

#### 4.3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de alimentos funcionales se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidante del organismo [82]. Por esta razón, en la actualidad muchos alimentos funcionales tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales de la dieta. En este contexto, la adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible para el desarrollo de alimentos funcionales con una actividad antioxidante incrementada [83]. De hecho, en el campo del desarrollo de nuevos ingredientes se está produciendo un aumento en la producción de este tipo de extractos vegetales en los cuales los compuestos bioactivos son aislados y



concentrados para su uso como suplementos, nutracéuticos o como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales[84].

La investigación debe demostrar dicha capacidad e intentar dar una aproximación más real del efecto potencial que podría ejercer *in vivo* un alimento rico en sustancias antioxidantes [85]. Para ello se mide la actividad antioxidante total del compuesto, extracto, ingrediente o alimento, o bien la actividad antioxidante de muestras biológicas relacionadas con éste. De esta manera se puede obtener información sobre posibles procesos de adición y sinergia que se producen como consecuencia de interacciones entre distintas moléculas bioactivas en la matriz de la muestra analizada. Por lo general, la actividad antioxidante total es mayor que la correspondiente a la suma de las actividades de los antioxidantes individuales que la componen, aunque también se pueden observar inhibiciones.

Sin embargo, la metodología de evaluación de la actividad antioxidante es compleja [86] y es necesario diseñar el estudio teniendo en cuenta el medio en donde se oxidan los radicales libres, y por tanto en donde deberían actuar los antioxidantes. Se pueden considerar cuatro medios diferentes: lípidos libres (p.e. aceites), lípidos dispersos (p.e. membranas y emulsiones), lípidos dispersos en organismos vivos (membranas y orgánulos) y reacciones de radicales libres en fluidos acuosos en el organismo (p.e. citoplasma y plasma). Las consideraciones sobre la acción prooxidante y antioxidante pueden tener diferentes implicaciones para cada uno de los medios. Es posible que un antioxidante sea efectivo en un sistema y cause daños en otro. Los antioxidantes de la peroxidación de lípidos pueden no proteger otros sistemas, tales como el ADN o las proteínas; a veces, incluso podrían acentuar el daño oxidativo.

Este comportamiento tan diverso es crucial en los ensayos *in vivo*, en los que la ingesta de un poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos podría inducir enfermedades al causar daños oxidativos en el ADN. Este comportamiento obliga a realizar numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* antes de autorizar el uso de un compuesto como aditivo antioxidante en alimentos.

Un problema adicional es la gran cantidad de métodos que existen para medir la capacidad antioxidante de un compuesto, siendo difícil la elección del método óptimo y la interpretación de resultados obtenidos con métodos diferentes. Por tanto, la evaluación de la efectividad de un alimento rico en antioxidantes se ha de abordar de distintas maneras.

#### 4.3.1.1 ENSAYOS PARA EVALUAR EL POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO MEDIANTE PRUEBAS QUÍMICAS.

En la bibliografía se describen numerosos métodos para predecir la protección frente a la oxidación que se puede atribuir a los antioxidantes de un alimento. La información suministrada por estos métodos es a veces muy cuestionada. Los modelos *in vitro* químicos hay que interpretarlos teniendo en cuenta todas sus limitaciones: medio de reacción, sustrato oxidable, radical, concentración de iniciador de la oxidación, etc. Los resultados son indicadores pero no está completamente demostrado que se puedan extrapolar a las condiciones fisiológicas. No obstante, son considerados buenas herramientas de screening en los protocolos para seleccionar extractos fenólicos o sus fracciones con alta capacidad antioxidante,

principalmente por la rapidez, reproducibilidad y bajo coste de este tipo de métodos. Como aval de la utilidad de estos métodos, algunos estudios han mostrado buenas correlaciones entre los resultados obtenidos en modelos animales con los resultados de la actividad antioxidante *in vitro*. A continuación se resumen las metodologías más utilizadas en el estudio *in vitro* de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos.

### **Análisis del contenido fenólico total**

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total [87]. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra en contacto con el reactivo de Folin-Ciocalteu causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de un fenol de referencia, habitualmente ácido gálico o ácido cafeico.

Se trata de un método simple y sensible pero que presenta algunas interferencias debidas a diversas sustancias de naturaleza no fenólica que también desarrollan coloración azul interfiriendo en la determinación, y que pueden dar lugar a una sobreestimación de la concentración fenólica de una muestra. Entre ellas destacan las proteínas, el ácido ascórbico, el ácido úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares y algunas sales inorgánicas [87]. No obstante, a pesar de estos inconvenientes, el ensayo de los fenoles totales se emplea con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales (ej. frutas y zumos de frutas), al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante [88].

El reactivo de Folin Ciocalteu también se ha empleado en estudios *in vivo* para la determinación de los niveles de compuestos fenólicos totales en plasma/suero tras la ingesta de alimentos ricos en fenoles [89, 90]. En este caso el plasma necesita una serie de tratamientos previos para eliminar las interferencias [90].

### **Métodos basados en la determinación de productos primarios de oxidación**

Hay un grupo de métodos basados en la medida de los productos que se originan en la oxidación de los lípidos. La oxidación de los ácidos grasos produce dienos conjugados, que se oxidan formando hidroperóxidos. Medir la formación de hidroperóxidos, por un método tan sencillo como una iodimetría, es probablemente el método más antiguo para conocer el alcance de una oxidación. También los dienos conjugados pueden ser un indicador del avance de la oxidación en las moléculas de ácidos grasos con insaturaciones. Los dienos absorben luz ultravioleta en las proximidades de 235 nm, por lo que pueden ser medidos en un espectrofotómetro.

### Métodos basados en la determinación de productos secundarios de oxidación

Esta estrategia de medir los productos de la oxidación secundaria parece adecuada para el estudio de sistemas lipídicos, así como en lípidos aislados de su entorno biológico, como los microsomas o las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los tres métodos más comúnmente utilizados son el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el índice de anisidida para determinar aldehídos volátiles y la determinación por cromatografía de gases de los compuestos resultantes del proceso de oxidación, como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos de cadena corta e hidrocarburos. Así, el propanal es el principal marcador de la oxidación de los ácidos n-3, mientras que el hexanal lo es de la familia de ácidos n-6.

También pertenecen a este grupo el método Rancimat [91]. El método Rancimat se designa también como test de Swift automatizado o test de oxidación acelerado y se emplea ampliamente como variante automatizada del método AOM (Active Oxygen Method). El Rancimat es un equipo que permite inducir la oxidación forzada de una grasa a la que se puede haber añadido el antioxidante objeto de estudio, o bien lo puede contener de forma natural como es el caso del aceite de oliva virgen. Es quizás uno de los métodos más habituales que emplea la industria alimentaria para evaluar la estabilidad oxidativa de alimentos grasos. En el caso concreto del aceite de oliva, los resultados de los análisis Rancimat muestran buena correlación con el contenido en fenoles totales [44, 92].

### Métodos basados en el secuestro del radical libre.

Uno de los mecanismos más importantes para prevenir la oxidación es el secuestro de radicales libres, dando por finalizada la cadena de oxidación. Consecuentemente, han sido propuestos numerosos métodos basados en incorporar al medio un radical, habitualmente una molécula estable comercial o un radical generado en el propio medio de reacción, y comprobar cómo le afecta la presencia de un antioxidante. Pertenecen a este grupo de métodos los ensayos conocidos por las abreviaturas DPPH, TEAC y ORAC.

En la actualidad el ensayo ORAC es uno de los más utilizados y utiliza la fluorescencia como técnica instrumental. El método está basado en comparar la pérdida de fluorescencia que se produce cuando la fluoresceína reacciona con un radical libre en presencia o ausencia de antioxidantes. Los antioxidantes presentes en el medio pueden reaccionar con el radical libre, neutralizando parte del daño al sustrato fluorescente; en consecuencia, anulando o retrasando la pérdida de fluorescencia. El método registra la fluorescencia a lo largo del tiempo y mediante la medida del área bajo la curva, convenientemente corregida con un blanco, se tiene la medida de la actividad antioxidante. Los resultados se expresan comparando las áreas de las curvas del antioxidante estudiado con las correspondientes al antioxidante de referencia Trolox.

El método ORAC ha alcanzado una gran difusión debido que ha sido adaptado a la medida en microplaca [93, 94], por lo que ha disminuido considerablemente el tiempo de análisis al poder determinar varias muestras a la vez. Además ofrece solución a otro de los problemas con los que el investigador se encuentra a la hora de medir actividad antioxidante: el antioxidante ha de ser soluble en los medios de reacción. En el método ORAC se ha propuesto una alternativa y se

distingue entre ORAC lipofílico y ORAC hidrofílico, es decir, es posible asignar la actividad antioxidante a la fracción hidrofílica y lipofílica del alimento [94]. Estas ventajas, unidas a que la FDA ha publicado tablas de referencia de actividad ORAC en alimentos (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>) han hecho que sea uno de los métodos de mayor aplicación en la actualidad.

### Métodos basados en la capacidad para reducir metales

La capacidad para reducir un catión se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. Uno de los métodos basados en esta consideración es el **ensayo FRAP** (*Ferric reducing antioxidant power*). Esta técnica fue desarrollada por *Benzie y Strain (1996)* [95] como método de medida de la capacidad antioxidante plasmática, aunque posteriormente ha sido aplicado a muestras de alimentos.

#### 4.3.1.2 ESTUDIOS EX VIVO

Los métodos *ex vivo* son un avance en el estudio de la capacidad antioxidante intentando una mayor aproximación a las condiciones fisiológicas. Están considerados como una etapa previa a los estudios en modelos animales y en humanos, dado que estos últimos son muy costosos y deben llevarse a cabo con un objetivo mucho más concreto. Con los modelos *ex-vivo* hay ventajas económicas, además de que ofrecen la posibilidad de criopreservación de los sustratos y de las líneas celulares durante largos periodos de tiempo, además de la facilidad de control de las condiciones experimentales.

Una primera aproximación es el estudio de la actividad antioxidante en sistemas en el que el sustrato es un sustrato fisiológico, como las LDL. Otro grupo de metodologías muy interesante es el basado en modelos celulares. Se consideran una herramienta útil en investigación nutricional, así como en la investigación encaminada a la validación de alimentos funcionales ricos en antioxidantes naturales, ya que proporcionan información valiosa sobre los mecanismos de acción y la eficacia protectora de sustancias bioactivas puras y extractos de alimentos ricos en antioxidantes[96-98]. Sin embargo, no se debe olvidar que los modelos celulares tampoco pueden reproducir con total exactitud las condiciones fisiológicas del organismo en su conjunto, ya que estos ensayos no consideran la absorción y metabolismo de los nutrientes [96, 98]. Además, tampoco están presentes las funciones sistémicas del organismo tales como los sistemas nervioso y endocrino. Por este motivo, el control del metabolismo *in vitro* debe ser menos constante que en la situación *in vivo*, lo que impide a las células cultivadas representar fielmente al tejido del que provienen [96]. Por esta razón, la extrapolación de los efectos observados *in vitro* a la situación *in vivo* debe hacerse con precaución y teniendo siempre presentes las limitaciones de estos modelos experimentales.

En los estudios con cultivos celulares para determinar la capacidad antioxidante encontramos 4 etapas fundamentales:

- Caracterización de las dosis citotóxicas de la muestra (compuesto activo o extracto de un alimento rico en antioxidantes), Esta primera etapa tiene como objetivo definir las dosis de

muestra que sean tóxicas para las células en cultivo, para posteriormente emplear aquellas dosis no tóxicas en la caracterización del efecto protector de la muestra.

- Suplementación de las células con dosis no citotóxicas de la muestra: las células son incubadas con el compuesto puro o el extracto que lo contiene.
- Inducción del estrés oxidativo. Las sustancias utilizadas para inducir el estrés oxidativo en estos ensayos son muy variadas: peróxidos orgánicos e inorgánicos, sistemas oxidantes basados en reacciones de Fenton, glutamato, peroxinitrito, etc... Entre estas sustancias, las más frecuentemente usadas y mejor caracterizadas son el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el *tert*-butilhidroperóxido (tB-OOH), dos compuestos capaces de inducir eficazmente la muerte celular y causar daño oxidativo al ADN, a los lípidos de membrana y a otras biomoléculas [99].
- Determinación de la protección ejercida por la muestra. La valoración del efecto protector proporcionado por la muestra se realiza mediante la evaluación de diferentes biomarcadores o parámetros indicadores de la extensión del daño causado por el inductor del estrés oxidativo. Así, se evaluarán cambios en la:
  - Tasa de muerte celular.
  - Formación de productos de peroxidación lipídica: malondialdehído e isoprostanos.
  - Generación intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS).
  - Oxidación del ADN: formación de 8-oxo-7,8-dihidroguanosina o rotura de las hebras.
  - Oxidación proteica: formación de grupos carbonilo.
  - Actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes y/o niveles de GSH y GSSG.

#### 4.3.1.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VIVO

Cuando se evalúa la eficacia de un alimento rico en antioxidantes naturales, la prueba más concluyente de su funcionalidad es sin duda su capacidad para producir mejoras en el estado antioxidante total de los individuos y cambios en determinados biomarcadores del daño oxidativo [100]. En las últimas décadas, diferentes estudios epidemiológicos han asociado el consumo de una dieta rica en alimentos vegetales con una menor incidencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo [101]. Esta observación ha dado lugar a la realización de numerosos estudios de intervención en humanos encaminados a la identificación de los compuestos bioactivos responsables de dichos efectos preventivos. Entre estos estudios, un gran número se han centrado en el potencial efecto beneficioso atribuido a los compuestos fenólicos [102].

En este tipo de estudios lo ideal es poder detectar la presencia de determinados compuestos fenólicos o sus metabolitos en plasma/suero y orina, como indicadores de su biodisponibilidad. Aunque los datos existentes sobre biodisponibilidad de compuestos fenólicos en humanos se considera aún escasos y controvertidos, diversos estudios evidencian la absorción y excreción urinaria de estos compuestos [102, 103] e incluso su incorporación a las LDL [104, 105]. No obstante, el análisis de compuestos fenólicos en los fluidos biológicos es complicado debido a las amplias diferencias estructurales de los compuestos fenólicos y a la gran variedad de

metabolitos generados en los procesos digestivos. Además, estos estudios requieren técnicas analíticas específicas como la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas para obtener datos consistentes [103, 106, 107].

Por esta razón, en los estudios de intervención que incluyen la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes es muy útil la evaluación de la modificación de biomarcadores del daño oxidativo sobre las principales moléculas diana del organismo: ADN, lípidos y proteínas. Además, en estos estudios es habitual determinar la actividad o capacidad antioxidante total del plasma o suero, que nos da información de la capacidad general de respuesta ante la oxidación y sobre posibles efectos cooperativos entre los distintos componentes de los sistemas de defensa antioxidante. De este modo, obtenemos información sobre el efecto de la exposición del organismo a los compuestos antioxidantes de la dieta [100, 108]. A continuación se describen brevemente algunos de los biomarcadores del daño oxidativo más frecuentemente empleados en modelos de cultivos celulares y en estudios de intervención.

### **Biomarcadores del daño oxidativo al ADN:**

La oxidación del ADN da lugar a un gran número de diferentes productos de la oxidación de azúcares y bases nitrogenadas, así como a la escisión de las hebras que componen la doble hélice.

A menudo se miden los **niveles de productos de la oxidación de las bases nitrogenadas del ADN** como la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-OHdG). Las determinaciones se pueden realizar mediante análisis cromatográficos (CG-MS, HPLC-DAD, HPLC-tandem MS), pruebas inmunoquímicas (ELISA), o con el uso del enzima formamidopirimidina ADN glicosilasa que convierte la 8-OHdG en hebras de ADN rotas, las cuales posteriormente son detectadas mediante el ensayo Comet [100].

Otra determinación habitual en células sanguíneas y células en cultivo es el grado de rotura de las hebras de ADN, denominado **ensayo Comet**, que se detecta habitualmente mediante electroforesis en gel. La rotura de las hebras permite que los bucles de ADN superenrollado se desplacen en el gel durante el desarrollo de la electroforesis, generando una imagen al microscopio que se asemeja a la de un cometa. La proporción de ADN en la cola indica la extensión de la fragmentación del ADN y por tanto de la extensión del daño. [100, 108].

Un método con una sensibilidad similar al anterior, pero en el que no se realiza electroforesis es el **Ensayo Halo Alcalino** [109]. Las células fijadas en gel se incuban en un tampón alcalino (pH 13) y los fragmentos de ADN se desplazan de modo radial generando una imagen al microscopio que se asemeja a un halo concéntrico a los restos del núcleo. El área del halo aumenta a medida que aumenta la fragmentación del ADN, en un proceso asociado a una reducción progresiva del área correspondiente a los restos del núcleo.

### Biomarcadores del daño oxidativo a lípidos:

La peroxidación lipídica es un proceso complejo que genera un gran número de productos finales de oxidación (ej. aldehídos, peróxidos lipídicos) en cantidades variables [110]. Por ello la peroxidación lipídica puede medirse de diversas maneras.

El método más rápido y sencillo es la **determinación colorimétrica** de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (**TBARS**). Esta técnica mide un cromógeno formado por el ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), que es un producto final de la peroxidación lipídica. Actualmente es frecuente el empleo de una modificación de este método en la cual el cromóforo TBA-MDA se analiza por HPLC. De este modo se reducen las interferencias de otras sustancias reactivas con el TBA, aumentando la sensibilidad y especificidad de la determinación [108].

El mejor indicador de la peroxidación lipídica *in vivo* parece ser la determinación de **isoprostanos**, que son productos específicos de la oxidación mediada por radicales libres de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Entre ellos se distinguen los isoprostanos F2, derivados de la oxidación del ácido araquidónico, y los isoprostanos F4, procedentes de la oxidación del ácido docosahexanoico. La determinación de isoprostanos se hace mediante CG-MS o inmunoensayo [108].

Otros indicadores de la peroxidación lipídica *in vivo* son los **hidrocarburos exhalados**, tales como pentano, que deriva de la oxidación de ácidos grasos n-6, y etano, que resulta de la oxidación de ácidos grasos n-3 [108]. No obstante, estos hidrocarburos son considerados productos minoritarios de la peroxidación lipídica [110].

### Biomarcadores del daño oxidativo a proteínas:

El proceso de oxidación proteica frecuentemente introduce nuevos grupos funcionales, como hidroxilos y carbonilos, que contribuyen a la alteración de la función de la proteína y a su posterior catabolismo [111].

El indicador más frecuentemente usado para la evaluación del daño oxidativo a proteínas es la determinación de la formación de **grupos carbonilo** mediante el ensayo colorimétrico de la dinitrofenilhidracina o mediante pruebas inmunoquímicas (ELISA). Aunque ambos métodos proporcionan valores absolutos diferentes, estos han mostrado una buena correlación cuando se han empleado en determinaciones plasmáticas [108].

Como alternativa a esta medida global de la oxidación proteica están las determinaciones de los **semialdehídos aminoalifáticos (AAS)** y **glutámico (GGS)**, principales contribuyentes a la medida total de grupos carbonilo [110] mediante ELISA.

Cada uno de los distintos tipos de metodología presentan sus limitaciones, pero la combinación de la información obtenida mediante pruebas químicas en conjunto con datos obtenidos con células en cultivo y estudios de intervención en humanos, hacen posible una caracterización adecuada de la seguridad y eficacia de un alimento funcional, así como de los mecanismos de

acción de sus compuestos bioactivos. Todos estos requisitos son necesarios para la validación de las declaraciones nutricionales y sus potenciales efectos beneficiosos.



## 4.4 BIODISPONIBILIDAD Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA FRACCIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA

### 4.4.1 BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La biodisponibilidad de las sustancias que se ingieren se define como la cantidad de sustancia que se absorbe y alcanza la circulación sistémica, momento en el cual puede distribuirse por los tejidos y alcanzar los lugares donde ejercer su efecto fisiológico [112]. Debido a esto, **es fundamental que los compuestos sean biodisponibles para que las propiedades beneficiosas que se les otorgan tengan realmente lugar en el consumidor, independientemente de la cantidad en la que aparezcan en la dieta.** Por tanto, hay que conocer el grado de biodisponibilidad de los compuestos para caracterizar su potencial saludable real.

El primer problema que surge a la hora de caracterizar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos es la dificultad que existe para **determinar con exactitud la cantidad y tipo de fenoles que se ingieren con la dieta** [113]. Se debe tener en cuenta que los efectos beneficiosos derivados del consumo de compuestos fenólicos dependen, además de por su biodisponibilidad, por la cantidad consumida. Pero, la gran diversidad estructural de los compuestos fenólicos [114], así como la influencia de los factores genéticos, agronómicos, del procesado y almacenamiento, varían enormemente el contenido fenólico, dificultando su seguimiento. Debido a esto y a otras razones, **existe una falta de metodología analítica estandarizada, que permita estimar la ingesta diaria de compuestos fenólicos, y más aun los provenientes de una fuente en particular, como en este caso, el aceite de oliva.** Generalmente se emplean o técnicas cromatográficas, que suelen infravalorar el contenido total de fenoles, o el método de Folin-Ciocalteu, que lo sobrevalora. Muchos autores se refieren a los datos publicados hace más de 30 años [115], donde se cifraba la ingesta de estos compuestos a 1g/día. Pero teniendo en cuenta datos posteriores [116], se puede decir que la ingesta es superior a este valor. Además se sabe que la ingesta de polifenoles depende en gran medida de los hábitos dietéticos. Por ello todavía no se tiene la información exacta del consumo de polifenoles diaria. Para el caso concreto del aceite de oliva, el consumo anual estimado de compuestos fenólicos aportados por esta fuente depende del país de estudio. Los valores en los países más representativos de consumo de aceite son, unos 9g/día en Grecia, 7,5g/día en Italia y 5,5g/día en España [117]. Se asume también que una dieta mediterránea rica en aceite de oliva provee de 10-20mg de compuestos fenólicos por día [63].

En segundo lugar se debe tener en cuenta que el concepto de biodisponibilidad **engloba un amplio número de etapas**, que finalizaría con el efecto biológico del compuesto fenólico o un metabolito de este sobre el tejido o compartimento celular diana. Hasta llegar a este punto, primero se deben considerar un gran número de variables durante [21]:

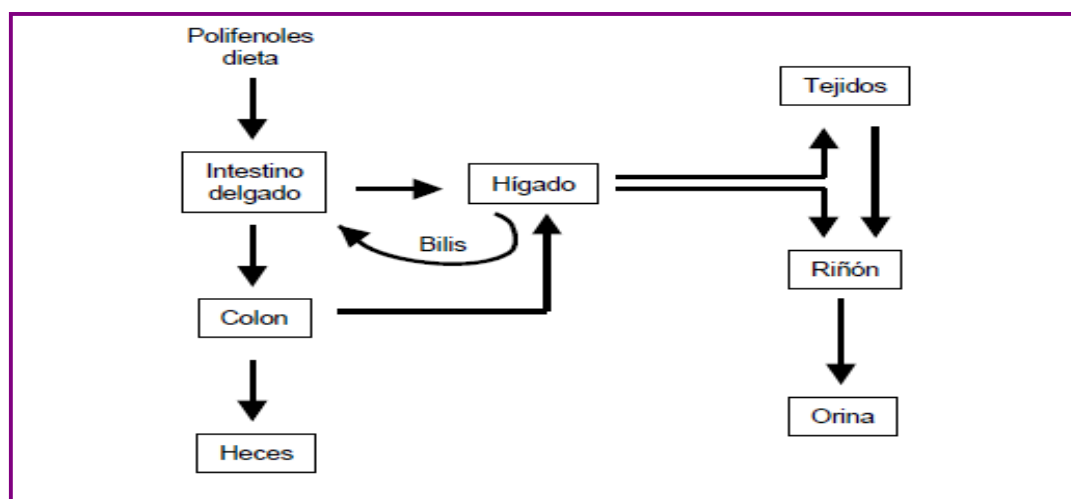
- La digestión, donde se puede producir un proceso metabólico por la microflora del aparato digestivo.

- La absorción intestinal, donde puede tener lugar otro proceso metabólico en los enterocitos de la pared intestinal.
- La circulación por el torrente sanguíneo y linfático.
- El metabolismo hepático.
- El proceso de captación en los tejidos diana y durante el metabolismo dentro de las células.
- El periodo de acumulación en los tejidos.
- La excreción biliar o urinaria.

Asimismo, hay que tener en cuenta que el **grado de biodisponibilidad varía ampliamente en función del tipo de polifenol**. Tanto la etapa de digestión y absorción a través del tracto intestinal como el transporte, metabolismo y efecto biológico se ven ampliamente influenciados por la estructura química del compuesto. Al mismo tiempo, se debe tener muy presente que las formas metabólicas que circulan en sangre y llegan a los órganos diana, no tienen porque desarrollar la misma actividad biológica y con el mismo rango de acción que sus formas nativas. Esto obliga a conocer bien la biodisponibilidad de los fenoles si se quieren afirmar sus efectos en el consumidor y realizar alegaciones de salud sobre ellos.

Por último, cabe destacar los **efectos de la matriz de los alimentos sobre la biodisponibilidad de los polifenoles**. Pueden darse interacciones directas entre los polifenoles y algunos componentes de los alimentos, como proteínas y polisacáridos, que podrían afectar al proceso de absorción de estos compuestos. También, la presencia en la dieta de algunos micronutrientes o agentes xenobióticos [21], pueden inducir o inhibir enzimas y /o transportadores involucrados en la absorción y metabolismo de los polifenoles. En el caso particular del aceite de oliva, algunos estudios han encontrado una baja disponibilidad de ciertos fenoles y flavonoides, debido a la fuerte interacción que existe entre ellos y la matriz alimentaria [118].

La **figura I 8** resume el proceso de absorción, transporte y eliminación de los polifenoles a través de los diferentes órganos corporales implicados.



**Figura I 8.** Proceso de absorción, transporte y eliminación de los polifenoles consumidos en la dieta a través de los diferentes órganos corporales humanos implicados. Adaptado de[119].

Como se puede observar en el esquema, los compuestos fenólicos están sujetos aun extensivo metabolismo hepático/intestinal en el organismo humano [117, 120-122].

### El proceso de digestión

Los polifenoles provenientes de la dieta en un primer lugar se ven sometidos a todo el proceso de digestión, en el cual factores como el pH gástrico e intestinal, las fermentaciones intestinales, la excreción biliar, el tiempo de tránsito en el tubo digestivo, etc., pueden afectar a la biodisponibilidad en general y a la absorción de los polifenoles en particular.

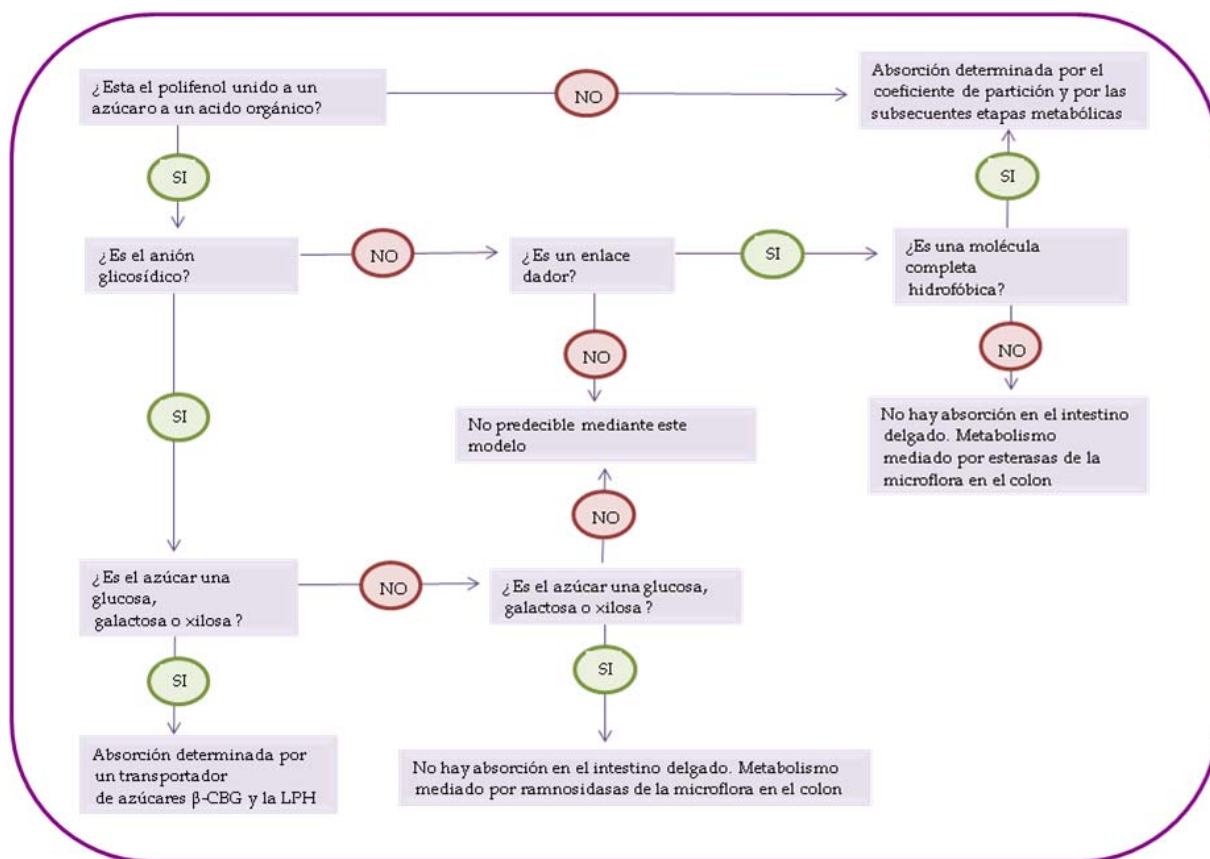
La mayoría de los compuestos fenólicos se encuentra en los alimentos en forma de ésteres, glicósidos o polímeros. Generalmente los glicósidos resisten la hidrólisis acida del estomago y llegan intactos al duodeno [123].

### El proceso de absorción

Una vez alcanzan el intestino delgado se desarrolla el proceso de absorción, el cual se ha iniciado en el estomago. Durante el curso de la absorción, los compuestos fenólicos pueden sufrir METABOLISMO DE FASE I, donde serán hidrolizados y/o deconjugados, o METABOLISMO DE FASE II, dentro del enterocito, donde pueden ser conjugados mediante reacciones principalmente de metilación, glucuronidación, sulfatación o sus combinaciones. Actualmente se están encontrando otro tipo de conjugaciones a destacar como la glutatiónización[124]. Estas reacciones de FASE II, son más frecuentes en el hígado ya que su finalidad inicial es aumentar la polaridad de las sustancias exógenas, para facilitar al organismo

su excreción. También algunos ácidos hidroxicinámicos pueden ser esterificados en el intestino, disminuyendo su grado de absorción. Se conoce que el metabolismo de los polifenoles presenta aspectos comunes para los diferentes grupos de compuestos fenólicos [125, 126]. La absorción y metabolización se ve influenciada por factores tales como la liposolubilidad o hidrosolubilidad de la molécula, la unión a azúcares o ácidos orgánicos, o el grado de polimerización [127].

Por lo general, en el intestino delgado solamente se *absorben* las agliconas y algunos glucósidos. [128-130]. En el año 2000, Scalbert [125] y col., basándose en datos obtenidos en estudios con humanos, estudios de especificidad enzimática y mediante modelos animales, desarrollaron una hipótesis de trabajo que permitía realizar una predicción de la absorción de los compuestos fenólicos de la dieta. Esta hipótesis queda esquematizada en la **Figura I 9**. Pese a todo esto, todavía no se conocen todos los mecanismos de la absorción gastrointestinal de los polifenoles.



**Figura I 9.** Esquema para la predicción de la absorción de los polifenoles en humanos. Adaptado de Scalbert, 2000 [125].

Esta hipótesis de trabajo se basaba en los siguientes resultados, los cuales generalmente han sido corroborados con estudios posteriores:

Existe un efecto del coeficiente de partición sobre la absorción de agliconas, glicósidos y compuestos fenólicos unidos a ácidos orgánicos. Algunos estudios afirman que las agliconas hidrofílicas no son capaces de atravesar la pared intestinal por difusión pasiva y por tanto su absorción depende de transportadores de membrana anión multi-específico[131]. Por ejemplo, se ha identificado en el yeyuno de ratas un mecanismo de transporte saturable dependiente de sodio para los ácidos ferúlicos y cinámicos [21, 132]. Sin embargo otros estudios revelan absorciones en el intestino delgado por difusión pasiva [133]. En el caso de compuestos hidrofóbicos glicosilados, unidos a ácidos orgánicos o con sustituyentes esterificados, el coeficiente de partición también influirá. Probablemente la mayoría de los glicósidos resisten la hidrólisis ácida en el estómago, pudiendo llegar intactos al duodeno[134].

La glicosilación o glucosilación, también influye claramente en la absorción de compuestos fenólicos. El destino de los glicósidos en el estómago no está claro.

La absorción gástrica de flavonoides ha sido observada en estudios en ratas. Se utilizaron ratas tratadas quirúrgicamente para que la absorción se restringiera al estómago. Se observó que es posible la absorción a nivel gástrico para algunos flavonoides, pero no para sus glicósidos [21, 128, 130].

El mecanismo de absorción de los glucósidos se conoce parcialmente. Estas estructuras se pueden transportar dentro de los enterocitos a través de un transportador dependiente de glucosa y sodio (SGLT1) [135, 136]. Dentro se pueden hidrolizar a través de las  $\beta$ - glucosidasas sistólicas [137, 138]. Otra vía de absorción es la hidrolasa floridzina lactasa, una glucosidasa de la membrana en cepillo del intestino delgado que cataliza la hidrólisis extracelular de algunos glucósidos, seguida de la difusión pasiva de las agliconas a través del borde en cepillo[139] [127, 140]. Podrían ampliarse estos mecanismos a polifenoles unidos a galactosa o xilosa. La variabilidad interindividual observada en la actividad de estas dos enzimas puede ser uno de los factores que explique la alta variabilidad en el porcentaje de compuestos fenólicos absorbidos que han sido publicados [103].

EL grado de polimerización de los compuestos fenólicos determina la facilidad con que son absorbidos en el intestino. Las formas diméricas o poliméricas de los compuestos fenólicos (procianidinas principalmente), por lo general, no son hidrolizadas a nivel gástrico, por lo que llegan intactos al intestino delgado.

A nivel del proceso metabólico, la importancia relativa de los tres tipos de conjugación, (metilación, sulfatación y glucuronidación) varía acorde con la naturaleza del sustrato y con la dosis ingerida del mismo. Posteriormente a estas conjugaciones, estos compuestos posiblemente sufran procesos de reconjugación, incluyendo deglucuronidaciones, seguidas de sulfataciones. Esto se ha podido observar en la quercetina.

Existe por tanto un complejo conjunto de enzimas que regulan la producción y liberación de los diferentes metabolitos de los compuestos fenólicos, lo cual afecta a su vez al sitio de acción y a la interacción con otros compuestos. Los enzimas más destacados son:

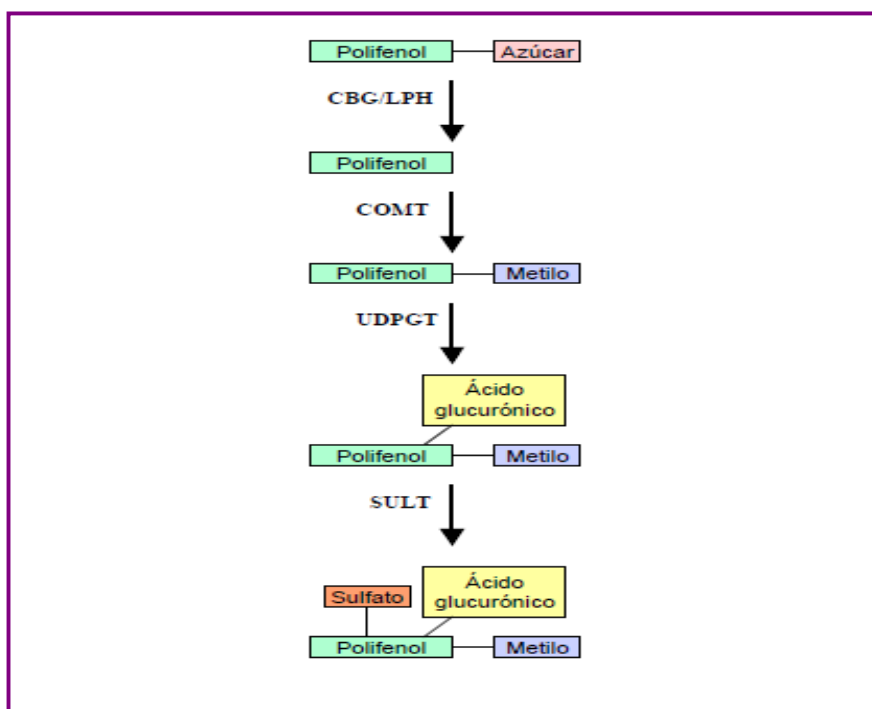
La metilación la realiza la enzima **Catecol-o-metil-transferasa**, la cual aparece en muchos órganos, principalmente en hígado y riñón [141, 142] aunque también se ha detectado la actividad de esta enzima para la catequina en el intestino delgado de ratas [143]. La enzima cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina a los polifenoles que poseen una subunidad catecol (*o*-difenólico). La metilación se produce principalmente sobre el C 3' del fenol, y en menos ocasiones se genera la forma 4'-*o*-metilo [21]. Se ha encontrado una gran cantidad de 4'-metilepigalocatequina en plasma de voluntarios humanos que ingirieron té [144, 145]. Este tipo de reacción está bastante descrita para la quercetina, catequina, epigalocatequina, hidroxitirosol, ácido homovainílico, ácido caféico y luteolina [21, 63, 117]. Además, Wu *y col.* (2002) [146] mostraron por primera vez la metilación de cianidina en humanos.

La sulfatación es mediada por la enzima **sulfotransferasa**, y tiene lugar principalmente en el hígado [142, 147]. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo sulfato de la 3-adenosina-5'-fosfosulfato a un grupo hidroxilo de diferentes sustratos (esteroides, ácidos biliares, polifenoles, etc.). Todavía no se han identificado claramente ni las isoformas que están involucradas específicamente en la sulfatación de los polifenoles, ni las posiciones de sulfatación de éstos. Pero la sulfatación sí es bien conocida para los ácidos p-cumárico, vainílico, ferúlico, isoferúlico, sinápico, kaempferol, tirosol, hidroxitirosol y quercetina [21, 117, 148, 149]. De momento se ha descrito que en el hígado hay una elevada actividad de SULTA1, mientras que en el colon la actividad más elevada es la de SULTA13, con una gran actividad sobre los grupos catecol que forman parte de los compuestos fenólicos. Por regla general, las sulfotransferasas son inducidas por la dieta, compuestos xenobióticos o por el ambiente [150]. Algunas sulfotransferasas son inhibidas por algunos polifenoles como es el caso de la quercetina que inhibe la sulfotransferasa humana SULTA1 [151]. SULTA1 también es inhibida por la ingesta de café fuerte o vino tinto desalcoholizado. No existe una enfermedad genética específica asociada con la deficiencia de sulfotransferasas, aunque existe una gran variación entre la población humana [152].

La glucuronidación es realizada por la **Uridin- bifosfato-glucuronosiltransferasa**. Este enzima se encuentra en la membrana del retículo endoplasmático de distintos tejidos. La presencia en la sangre portal y mesentérica de metabolitos glucuronidados tras realizar una perfusión con polifenoles en el intestino delgado de ratas muestra que la glucuronidación de los polifenoles ocurre principalmente en los enterocitos del intestino antes de que estos compuestos sean más conjugados en el hígado [153-155]. Cataliza la transferencia de un ácido glucurónico desde el ácido UDP-glucurónico a esteroides, ácidos biliares, polifenoles y miles de componentes de la dieta. Cabe destacar que se han detectado 15 estructuras distintas de este enzima en humanos. Estas poseen una gran especificidad por sustratos con diferente distribución tisular [156]. La subfamilia UGT1A se encuentra en el intestino y probablemente juegue un papel fundamental en el metabolismo de los polifenoles.

Pero pese a esta especificidad, poseen un amplio patrón de expresión polimórfico, apareciendo una elevada variabilidad interindividual en la glucuronidación de los polifenoles. Las isoenzimas activas de la familia 1A difieren según el polifenol considerado [157, 158]. El nivel más elevado de conjugación se observa en la posición 7 del polifenol, mientras que la posición 5 no parece ser un lugar donde se lleve a cabo este tipo de reacciones de glucuronidación. La glucuronidación es bien conocida para los ácidos p- cumárico, vainílico, sinápico, ferúlico, kaempferol, quercetina, tirosol e hidroxitirosol [63, 117, 148, 149, 159].

Por término general, la metilación es la conjugación más abundante. La sulfatación es una vía que posee una mayor afinidad por los sustratos fenólicos pero esta conjugación se satura antes que la glucuronidación, ya que cuando las dosis ingeridas aumentan, se observa una tendencia mayor hacia la glucuronidación [160]. Las especies, el sexo y la privación de alimentos afecta al balance entre la sulfatación y la glucuronidación de los polifenoles [21, 161]. Generalmente, la concentración de la aglicona libre en el plasma tras la ingesta de una dosis nutricional es baja, excepto para las catequinas de té (se ha detectado 77% de epigalocatequina galato en el plasma) [145]). Sin embargo también, se ha observado saturación en los procesos de conjugación en ratas a las que se les ha administrado una elevada dosis de polifenoles y en ratas a las que se les ha suministrado una dosis aguda de éstos[142, 153], lo cual perjudicaría a la absorción.. También se especula con la posibilidad de que exista una inhibición competitiva de la conjugación entre polifenoles y compuestos xenobióticos en el intestino [21]. Bajo estas dos condiciones podrían circular por el torrente sanguíneo cantidades significantes de agliconas libres, probablemente con efectos biológicos diferentes a los que tendrían los metabolitos conjugados. En la figura I 10 se muestran las etapas existentes en el metabolismo de los polifenoles.



**Figura I 10** Esquema simplificado que muestra el metabolismo de los polifenoles. CBG:  $\beta$ -glucosidasa citosólica; LPH: lactato florizina hidrolasa; COMT: catecol-O-metil-transferasa; UDPGT: UDP glucuronosil transferasa; SULT: sulfotransferasa. Adaptado de Scalbert,2000 [125] .

### El proceso de transporte en plasma.

Aquellos compuestos fenólicos que sean absorbidos, conjugados o no, son **transportados en plasma** a los distintos tejido y órganos. Diversos estudios han intentado caracterizar el perfil fenólico del plasma a nivel de **concentraciones máximas, vidas medias, estructuras químicas en las que se transforman y mecanismos de transporte**.

En el primer caso, el tipo de fenol y de fuente alimentaria son factores determinantes. Los datos que se conocen oscilan entre unos 0,1 a unos 0,75  $\mu$ moles equivalentes de quercetina/L de plasma[21]. Por otro lado, la vida media en sangre de los compuestos fenólicos no es muy conocida, se estima que es de 11 a 28 h para la quercetina, de 4 a 8 h para las isoflavonas o de unas 2 horas para los antocianos [10]. Generalmente, los principales compuestos que circulan por el torrente sanguíneo son conjugados glucurónidos [21].

Por otro lado se ha estudiado los mecanismos de transporte, determinándose que pocas veces circulan libres en sangre. En general los compuestos fenólicos y sus metabolitos muestran una mayor afinidad por los ambientes acuosos del organismo debido a su carácter hidrofílico [21]. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado su afinidad por las proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina, exceptuando los antocianos, que circulan mayoritariamente en forma glucosídica [149]. Pero esta afinidad varía en función de las características estructurales de los compuestos fenólicos, por ejemplo en función de la posición de la sulfatación o glucuronidación [21]. Cuando se origina un cambio conformacional en la albúmina, por ejemplo por cambios en el pH, se produce la disociación de los polifenoles ligados, incorporándose estos a las células y tejidos [21]. A este respecto un estudio *in vitro* ha revelado la posibilidad de un flujo bidireccional de quercetina entre la albúmina y la hemoglobina. Esto sugiere que los eritrocitos puedan desempeñar un papel importante en la distribución y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos circulantes, al actuar como reservorios naturales de estas sustancias[162].

Pero estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que, aunque en menor medida, las lipoproteínas estarían implicadas en el transporte de los compuestos fenólicos [163]. Los polifenoles se asocian a las lipoproteínas a través de interacciones iónicas con residuos que se encuentran cargados en la superficie de la partícula [164, 165]. Es este mismo hecho lo que explica, entre otras causas, su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, particularmente a nivel de las LDL, como se ha planteado en este trabajo.

### El metabolismo hepático

Cuando llegan al **hígado**, algunos compuestos fenólicos o sus metabolitos son **metabolizados** (mediante reacciones de conjugación con grupos metilo, sulfatos y glucuronidos), y regresan al



torrente sanguíneo y otros son **eliminados vía bilis**, pudiendo alcanzar otra vez el intestino delgado.

El **destino metabólico en el hígado** de los conjugados producidos en el intestino no está demasiado claro. En ciertos casos el nivel de metabolización es muy elevado, en otros no se produce ningún tipo de conjugación. Esto último puede deberse a un nivel muy bajo de penetración del polifenol dentro de las células o por una baja afinidad de las enzimas implicadas en este metabolismo por este sustrato. Parece probable la existencia de una compleja serie de enzimas conjugadoras y transportadores de los hepatocitos involucrados en la regulación de la absorción, producción y liberación de varios metabolitos de los polifenoles [166, 167]. La actividad de estas enzimas y de los sistemas transportadores depende de la naturaleza del polifenol y también pueden estar influenciados por polimorfismos genéticos que provocan importantes diferencias interindividuales en la capacidad de metabolizar los polifenoles [21].

Los compuestos fenólicos que siguen la **ruta biliar** son secretados en el duodeno, donde son sometidos a la acción de enzimas bacterianas, especialmente la  $\beta$ -glucuronidasa, tras la cual son reabsorbidos. Este reciclaje entero hepático prolonga la presencia de los compuestos fenólicos en el organismo y puede detectarse con una nueva subida de la cantidad de ese polifenol en intestino [168]. Los metabolitos de polifenoles de elevado peso molecular, generalmente por estar altamente conjugados, tienden a ser excretados por esta ruta. [169].

### **El metabolismo en los tejidos.**

Del mismo modo, los polifenoles también pueden ser **metabolizados en los tejidos**, desde donde pueden ser **transportados al riñón para su eliminación vía orina**. Ésta es otra forma de eliminación de los compuestos fenólicos del organismo.

La caracterización de metabolitos en los **tejidos** podría ser mucho más interesante que la determinación de la concentración de estos en el plasma. Es aquí donde seguramente realicen su actividad y por tanto será la capacidad biológica de esta forma metabólica la que interese conocer. Pero hasta ahora existen pocos estudios realizados. Los estudios existentes trabajan con polifenoles marcados radioactivamente. Esta radioactividad se recupera principalmente en sangre y en tejidos del sistema digestivo: estómago, intestino e hígado. Aunque también se han detectado en otros tejidos como el cerebro, corazón, riñón, páncreas, próstata, útero, glándula mamaria, testículos y piel. Pero por ahora todo ello ha sido realizado sobre ratas y ratones [168, 170]. En función del tejido, de la dosis administrada y del tiempo al cual se toma la muestra de tejido, el rango de concentraciones detectadas es de 30-3000 ng equivalente de agliconas/g de tejido. Pero se desconocen muchos datos a este nivel: La cinética de penetración y eliminación de los diferentes fenoles en los diferentes tejidos, el grado de almacenamiento en el tejido, los mecanismos de penetración a los tejidos y el metabolismo que se produzca en esos tejidos.

Por el contrario, existen bastantes estudios en humanos a cerca de la **excreción vía urinaria** de los polifenoles. Generalmente los metabolitos de los polifenoles de bajo peso molecular (bajo nivel de conjugación), tienden a ser eliminados por esta ruta [169]. Habitualmente el nivel de

excreción de polifenoles a través de la orina está correlacionado con las concentraciones máximas que se encuentran en el plasma. Los casos en que no exista esta relación proporcional, se podría deber a la mayor eficacia de la excreción biliar con respecto a la urinaria o al elevado grado de metabolismo dentro del organismo.

### El metabolismo en el intestino grueso.

Por otra parte, tanto los polifenoles provenientes de la dieta que han alcanzado el intestino y que no son absorbidos (compuestos hidrofílicos, por ejemplo), como los polifenoles que sí se han absorbido en el intestino y que luego han sido metabolizados en el hígado y excretados a la bilis, alcanzan el **intestino grueso**, donde son **metabolizados por las bacterias** presentes en este órgano.

Estos últimos llegan al colon con una forma química diferente, por ejemplo como glucurónidos [171]. Aquí, los enzimas de la microbiota pueden hidrolizar los glicósidos en agliconas. Por ejemplo, los polifenoles unido a azúcares tipo Ramnosa llegan al colon, donde serán hidrolizados por las ramnosidasas de la microbiota, tras lo cual serán absorbidos [172-174]. Se podría aplicar lo mismo en los polifenoles que están unidos a arabinosa y a xilosa, aunque no se han estudiado de forma específica. El proceso de absorción en el colon de estos metabolitos se lleva a cabo con mayor dificultad que aquellos que se absorben en el intestino delgado, ya que el área de intercambio es más pequeña. Asimismo, las esterasas degradarán compuestos hidrofílicos, como paso previo a su absorción en el colon [140]. También estas enzimas pueden metabolizar las agliconas. Se puede producir la rotura de los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos y la consiguiente producción de ácidos aromáticos simples [115, 175, 176], llegándose a formar derivados del ácido benzoico, generalmente de menor biodisponibilidad y actividad. En el caso de polímeros y oligómeros de procianidinas se ha comprobado *in vitro* que la microflora del colon es capaz de romperlos en ácidos fenólicos de menor peso molecular, que podría facilitar su absorción en el colon. [177]. Los compuestos resultantes de este metabolismo son de un tamaño molecular inferior al de los compuestos de los que provienen. Este hecho hace que estos nuevos compuestos formados puedan ser absorbidos fácilmente en el colon o bien ser eliminados del cuerpo vía heces. Por tanto existe una diferencia con respecto a los enzimas de los tejidos, ya que estos no catalizan la rotura de los polifenoles a compuestos más simples. Aquellos que se absorben pueden ser conjugados con glicina, ácido glucurónico o sulfato [21]. Estas rutas metabólicas todavía no están totalmente caracterizadas en humanos.

También a este nivel, los metabolitos generados pueden ejercer importantes funciones como antioxidantes [127]. Las concentraciones de polifenoles en el colon pueden alcanzar varios cientos de micromoles por litro y junto con los carotenoides son los principales antioxidantes que se encuentran en este lugar, ya que las vitaminas C y D son absorbidas en el intestino delgado.

El colon puede llegar a contener alrededor de  $10^{12}$  microorganismos por  $\text{cm}^3$  con un potencial hidrolítico y catalítico enorme. Las reacciones de deconjugación ocurren fácilmente. Podemos encontrar microorganismos como *Bacteroides distasonis* (que poseen actividad  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa), *Bacteroides uniformis* (con  $\beta$ -glucosidasa) y *Bacteroides ovatus* (también con  $\beta$ -

glucosidasa) [171]. *Enterococcus casseliflavus* utiliza parte del azúcar de la quercetina-3-O-glucósido para dar como productos formiato, acetato y lactato pero no metaboliza más la aglicona.

En esta etapa es muy importante tener en cuenta las variedades interindividuales y la influencia de la composición de la microbiota [21]. Pese a ello no debe dejarse de lado, pues en bastantes ocasiones el grado metabólico de algunos fenoles es mucho más intenso a nivel de colon que a nivel tisular [149, 175]. Por tanto, la identificación y cuantificación de los metabolitos microbianos constituyen un importante campo de investigación pues alguno de ellos podrían tener efectos fisiológicos o podrían servir como biomarcadores de la ingesta de polifenoles[178, 179].

#### 4.4.2 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA FRACCIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA.

Simultáneamente a los estudios sobre biodisponibilidad del aceite de oliva, se han llevado a cabo numerosos proyectos de investigación para analizar la respuesta de determinados marcadores relacionados con algunas patologías, como los marcadores de estrés oxidativo, a la ingestión de aceite de oliva. Durante una época la investigación sobre la repercusión del aceite en la salud se centró en la influencia de su capacidad antioxidante sobre los procesos ateroscleróticos.

##### 4.4.2.1 EL ACEITE DE OLIVA Y LA ATEROSCLEROSIS.

Actualmente, el envejecimiento de la población se ha transformado en una preocupación social y económica en los países desarrollados. Esto es debido al gran número de personas que sufren una serie de patologías crónico-degenerativas que pueden estar relacionadas con la edad avanzada, como son las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas[23, 180-182]. Muchas investigaciones además apuntan hacia la **estrecha relación que existe entre los procesos de oxidación y las enfermedades degenerativas** ya mencionadas.

Las enfermedades cardiovasculares, expresión clínica de la aterosclerosis, constituyen una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad de las sociedades occidentales. En España supone el 44% de la mortalidad en adultos y en Europa mueren cada año debido a estas enfermedades o a sus complicaciones unos cuatro millones de personas[183].

Por ello en los últimos años se han intensificado los esfuerzos encaminados a descubrir nuevos factores de riesgo cardiovascular, sus mecanismos de actuación intermedios y los **tratamientos que intentan reducirlos**.

La aterosclerosis es un proceso activo, no degenerativo, largo y lento. Se caracteriza por un engrosamiento subíntimo a modo de parches (ateroma) de las grandes y medianas arterias, que pueden disminuir u obstruir el flujo sanguíneo. Estas placas de ateroma están causadas

principalmente por un proceso de **inflamación crónica**, en el que participan, por tanto, elementos característicos de dicha inflamación como:

Los mecanismos a nivel celular (células endoteliales, monocitos, células de músculo liso y plaquetas) y los mecanismos a nivel molecular (alteración de la lisura endotelial y lesión con aumento de la permeabilidad)

La primera lesión detectable de la aterosclerosis es la **disfunción endotelial** y la formación de la **estría grasa** (formada por células espumosas cargadas de lípidos, resultado de los macrófagos emigrados como monocitos y linfocitos T de la circulación a la capa sub-endotelial de la intima), que mas tarde evoluciona a la **placa fibrosa** (formada por células musculares lisas de la intima, rodeadas por tejidos conjuntivo y lípidos intra y extra celulares). Es entonces cuando los vasos ateroscleróticos presentan una expansión sistólica reducida y una propagación en ondas anormalmente rápidas [184].

Todo ello puede transcurrir sin sintomatologías hasta estadios avanzados en los que se manifiestan complicaciones coronarias, cerebrales, digestivas o enfermedades oclusivas de las arterias periféricas[183].

El riesgo de desarrollar la enfermedad cardiovascular, partiendo de la disfunción endotelial, depende de numerosos factores. Estos factores pueden ser ambientales o genéticos y muchos de ellos son desconocidos hasta el momento. Entre los diferentes factores encontramos, el tabaquismo, la hipertensión arterial, dislipemias (destacando la hipercolesterolemia: el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad), síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, infecciones microbianas de *Herpesvirus* o *Chlamydia pneumoniae*, radicales libres del oxígeno, elevación de la homocisteína, déficit estrogénico...*etc.* o las combinaciones entre ellos[185, 186].

#### 4.4.2.1.1 LDL, factor desencadenante del proceso Aterosclerótico.

La aterosclerosis, hasta hace no mucho tiempo, se consideraba un proceso degenerativo de la pared arterial, fundamentalmente ligado al envejecimiento y, por tanto, irreversible. Posteriormente se estableció la **hipótesis lipídica**, [187] en los años 50 que otorgaba a la hiperlipidemia el papel de iniciador del proceso, cuando se identifico la existencia de un depósito de grasa en la pared del ateroma. En la actualidad, **pese a no conocerse completamente todos los mecanismos precisos**, es aceptada la **teoría oxidativa de la arteriosclerosis**, basada en evidencias científicas que relacionan de forma directa la acumulación en macrófagos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que han sido mínimamente oxidadas en el espacio subendotelial [188], con el inicio de la patología.

### LAS LIPOPROTEINAS

Son complejos macromoleculares solubles formados por proteínas y lípidos. Su función es la de facilitar la circulación de estos lípidos en el plasma, solucionando así el transporte de compuestos con carácter hidrofóbico en un fluido acuoso. Las lipoproteínas, por tanto, transportan todos los lípidos que circulan en el plasma: colesterol, en su forma libre y

esterificada, triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL) [189]. La albúmina se encarga de los ácidos grasos libres. Los lípidos no polares, como el colesterol esterificado y los triglicéridos, conforman el núcleo hidrofóbico de la estructura lipoproteica, mientras que la superficie hidrofílica esta compuesta por grupos lipídicos más polares, como el colesterol libre y los fosfolípidos, intercalados con moléculas proteicas, lo cual permite la solubilidad de los complejos. La fracción proteica de las lipoproteínas se halla integrada por diferentes polipéptidos específicos, denominados apoproteínas (Apo) que se designan con las letras A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>4</sub>, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, F, G, y H. Estas intervienen activamente en el metabolismo de las lipoproteínas, desempeñando funciones específicas, tales como cofactores enzimáticos o mediadores, en la interacción con receptores específicos de membrana [190]. Todas ellas son sintetizadas y secretadas por el hígado y el intestino [191].

### LA LDL, LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD

Es una partícula de 18 a 26 nm de diámetro, con una densidad de 1.006-1.063 kg/l y una masa molecular de 2.5 millones de Daltons [181, 192]. La superficie representa el 54% de la partícula, siendo el resto el núcleo. Esta formada por un 22-27% de proteínas, siendo la principal la Apo B100 (el 19% de estas proteínas está localizado en la superficie), un 73-78% de lípidos (40-50% es colesterol) de los que el 8% se localiza en la superficie, y el resto se acumula en el núcleo. Dentro de esta fracción de colesterol, un 32-38% se encuentra en forma esterificada, mientras que un 8-8.5 % aparece en forma no esterificada. Dentro de la fracción de lípidos, el 4-10% corresponde a triacilglicéridos situados en el núcleo y un 15-26% a fosfolípidos, situados mayoritariamente en la superficie de la partícula [193, 194] [195]. Los ácidos grasos poliinsaturados son mayoritarios, en especial el ácido linolénico. Dentro de la LDL, podemos hablar de diferentes subclases en función del tamaño, el cual resulta inversamente proporcional a la concentración de triacilglicéridos, siendo las partículas más pequeñas y densas las más susceptibles a la oxidación (Figura I.11).

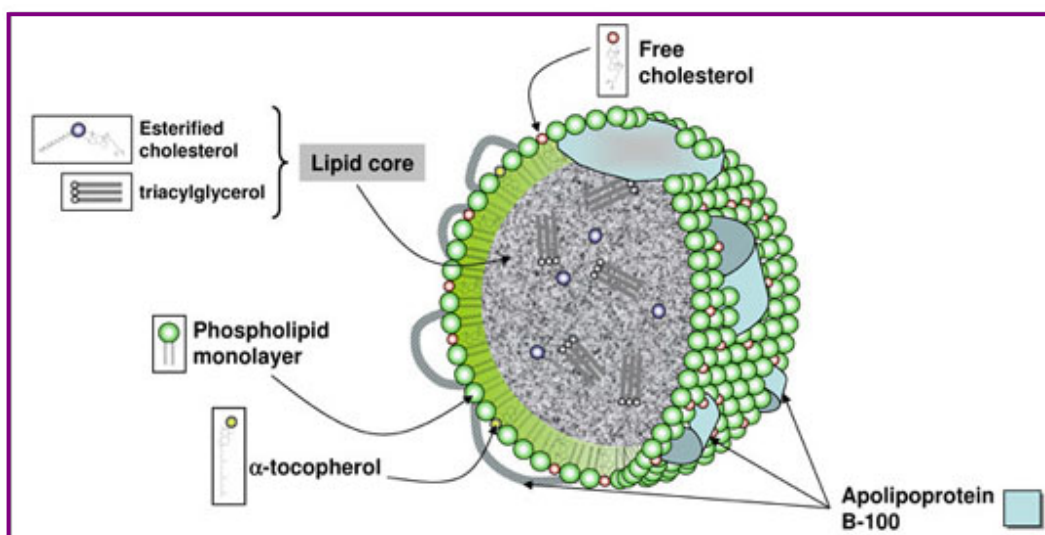


Figura I.11. Estructura de la LDL

Es importante para nuestro estudio tener en cuenta el contenido de antioxidantes que puede contener la LDL. El  $\alpha$ -tocoferol es el antioxidante que aparece en más concentración, con una estimación de 6 moléculas por partícula [181], además puede contener alrededor de 7-93  $\mu\text{g}$  de vitamina E por mg de proteína [196]. La concentración de compuestos fenólicos está en torno a los 6.61  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína [105]. Además, contiene otros antioxidantes en concentraciones minoritarias como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, criptoxantina, cantaxantina, luteína, fitoflueno y ubiquinol-10 [195, 197, 198].

### **MODIFICACIONES DE LAS LDL**

Los mecanismos precisos por los cuales las LDL producen aterosclerosis, es decir, los pasos que median entre la infiltración de la LDL en la pared arterial y la formación de una lesión aterosclerótica, no se conocen completamente. En la actualidad se mantiene que la LDL ha de sufrir una serie de modificaciones antes de convertirse en aterogénica.

No obstante, durante la última década los diferentes estudios han permitido establecer una relación directa entre la oxidación de las LDL y la aterogénesis [199-206]. La susceptibilidad de las LDL a su oxidación está relacionada con tres factores clave:

1. La formación de radicales libres.
2. La presencia de un sistema de defensa antioxidante que puede ser:
  - de origen endógeno (sintetizado por el propio organismo), formado por la superoxidodismutasa (SOD), la glutatiónreductasa (GPX) o la paraoxonasa (POX).
  - de origen exógeno (proveniente de la dieta), donde se incluiría las vitaminas E y C, los  $\beta$ -carotenos y los polifenoles.
3. Las características de la partícula de LDL:
  - Tamaño y densidad. Las más grandes y menos densas son menos susceptibles a la oxidación. Por el contrario, las más pequeñas y densas presentan una distribución espacial diferente, que impide que sean reconocidas por los receptores B: E (factor positivo para el desarrollo de la aterosclerosis). Además, este menor tamaño, induce a una aproximación en las cargas positivas de los aminoácidos arginina y lisina en la cadena peptídica de las Apo B, que aumenta la afinidad por los proteoglicanos (factor positivo para el desarrollo de la aterosclerosis). Por último, al ser más pequeñas, atraviesan más fácilmente la íntima.
  - El tipo de ácido grasos que contenga. Un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados aumenta la susceptibilidad de la LDL a la oxidación.
  - El grado de glicosilación. Una mayor glicosilación facilita la oxidación.

El sumatorio de todos estos factores, fundamentalmente el aumento de carga y densidad de la partícula y la disminución de tamaño producen una serie de cambios importantes en la

estructura de la LDL, a partir de los cuales dejan de ser reconocidas por los receptores B/E y pasan a ser captadas por los macrófagos a través de los receptores “*scavenger*”.

Estos cambios se producen a dos niveles:

- **a nivel lipídico**[207], los ácidos grasos poliinsaturados que esterifican al colesterol, triglicéridos y fosfolípidos dan origen a fragmentos hidrocarbonados cortos: hidroxiácidos, peroxiácidos, oxisteroles y aldehídos.
- **a nivel proteico**, los aldehídos formados actúan sobre los grupos amino de la lisina presente en la Apo B, uniéndose covalentemente y neutralizando las cargas positivas de la cadena peptídica, de manera que ésta se torna más frágil y finalmente se fragmenta.

Estas modificaciones son desencadenadas por los **radicales libres**. Un radical libre es una especie química definida que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que le hace ser un compuesto altamente inestable y reactivo. Con el fin de estabilizarse, el electrón desapareado busca aparearse, generando otros radicales libres al mismo tiempo que dañan de forma reversible o irreversible cualquier tipo de molécula, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos e hidratos de carbono. Por tanto, los radicales libres tienen una gran capacidad para formar otros radicales libres, desencadenando una reacción en cadena, donde también pueden generarse otras sustancias tóxicas [208, 209].

Los radicales libres son producidos por las tres principales células presentes en la pared arterial: las células endoteliales, las células del músculo liso y los macrófagos. Los radicales libres se producen de forma general durante el metabolismo celular, principalmente a través de mecanismos oxidativos [210], como la cadena de transporte electrónico mitocondrial o la actividad de las enzimas NADPH oxidasa, mieloperoxidasa, citocromo P<sub>450</sub>, xantina oxidasa, ceruloplasmina y lipooxigenasa [211].

Durante estos procesos, se produce una reducción parcial de la molécula de oxígeno que dan lugar al hidropéroxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidropéroxilo (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e hidroxilo(OH<sup>•</sup>) entre otros. Cuando los niveles de colesterol sérico están elevados se producen radicales superóxido en grandes cantidades (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) que inactivan el NO y promueven la formación de otros radicales de oxígeno como el peroxinitrito y el radical hidroxilo[212]. La definición de radical libre también incluye los metales de transición cuando estos tienen uno o más electrones desapareados[213].

Antes de describir las etapas que componen el proceso de oxidación de las LDL, hay que recordar que el término LDL oxidada no define una especie molecular específica. La LDL oxidada hace referencia a un conjunto heterogéneo de formas de la LDL, que difieren entre ellas tanto en composición química como en propiedades funcionales [214]. Estas aparecen cada una de ellas en diferentes niveles o grados de oxidación.

El proceso de conversión de la LDL nativa hasta la forma completamente oxidada se produce mediante dos mecanismos o etapas: Oxidación de la fracción de lípidos y oxidación de la fracción de proteína.

#### 1. Oxidación fracción lipídica:

**FASE DE ANTIOXIDACIÓN O LATENCIA.** La oxidación de LDL se inicia por las especies reactivas de oxígeno que sustraen un protón ( $H^+$ ) de un doble enlace en los PUFA, al que sigue una reordenación molecular que da lugar a la formación de dobles enlaces conjugados, conocidos como **dienos conjugados** (CD) [215]. En un principio, la barrera defensiva que crean los antioxidantes endógenos ( $\alpha$ -tocoferol, ubiquinol-10,...) presentes en la LDL frena el proceso hasta su total consumo. Tras esto, se desencadena el proceso de **estrés oxidativo**, al producirse un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la defensa antioxidante del organismo.

**FASE DE PROPAGACIÓN**, de la peroxidación (proceso radicalario autocatalítico) que implica la abstracción de otro protón ( $H^+$ ) por el radical peroxylo (LOO.) de otro PUFA (generado por la reacción del dieno conjugado y el  $O_2$  en condiciones aeróbicas), produciendo la formación de los hidroperóxidos lipídicos. En este punto también se forman **lisofosfolípidos** (producto de la hidrólisis parcial de los fosfolípidos como: **PLPC, SGPC, OGPC, POVPC, PGPC**) [216].

**FASE DE DESCOMPOSICION**, (oxidación lipídica secundaria) en la cual los radicales peroxi antes mencionados pueden transformarse en peróxidos cíclicos que por hidrólisis de los lípidos y polipéptidos, generan fragmentos hidrocarbonados de cadena corta de marcada reactividad, entre los que se destaca el **malondialdehído (MDA)**, el **4-hidroxinonenal glutamilesemialdehído (GSA)** y **semialdehído aminoadipico (AASA)** los cuales actuarán de catalizadores de la oxidación proteica [214]. Asimismo en esta etapa se produce la oxidación del colesterol, apareciendo los oxiesteroles como: 7 cetocolesterol, 5,6-apoxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 7  $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7  $\beta$ - hidroxicolesterol, etc.[217].

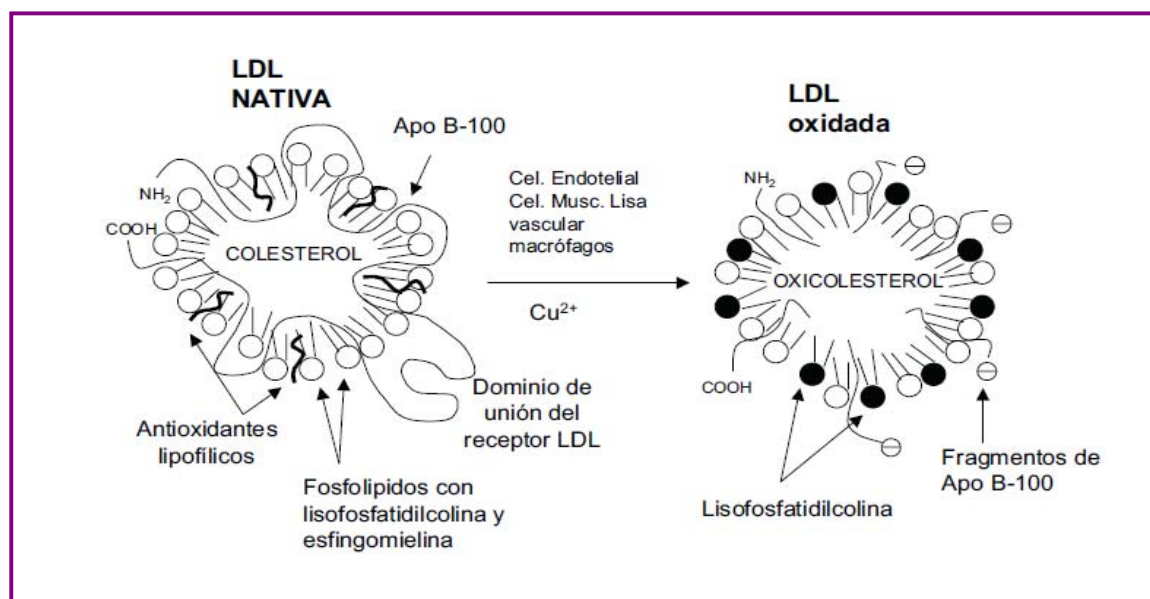
#### 2. Oxidación de la fracción proteica:

Se produce la oxidación inmediata y preferente de los residuos de aminoácidos de la apo B-100 [218, 219], donde el principal objetivo es el aminoácido lisina, junto con un escaso consumo de los antioxidantes liposolubles y una escasa ausencia de la peroxidación lipídica [220].

Además de la fragmentación proteica, se induce una unión covalente de los aldehídos con los grupos N-amino, principalmente de los residuos de lisina de la apo B-100 pero también con los de arginina y prolina. Esto produce unas modificaciones que dan lugar a nuevos grupos funcionales como **proteína-carbonilos**, ácidos sulfónicos y ácidos carboxílicos, lo cual completa el proceso de oxidación y aumenta la movilidad electroforética de la partícula de LDL [215].

En la **figura I.12** se esquematiza los efectos de la oxidación:





**Figura I.12.** Representación esquemática de la conversión de la LDL nativa en LDL oxidada y los cambios físicoquímicos que acompañan dicha oxidación[1].

### **EFEECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA SOBRE LA LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD**

La confirmación del importante papel de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas en el inicio de la aterosclerosis [199], dio lugar a diferentes hipótesis sobre las posibles vías de prevención de esta enfermedad, concretamente a la incorporación de antioxidantes en la dieta. Los primeros estudios *in vitro* que se llevaron a cabo se centraron en inducir la oxidación de las LDL aisladas mediante sulfato de cobre, y observar la capacidad protectora que tenían la oleuropeína y el hidroxitirosol en concentraciones entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ . Los resultados mostraron una relación dosis dependiente de estos dos fenoles frente a la inhibición de la oxidación[221, 222].

También se ha podido observar, que la ingesta de bajas dosis de hidroxitirosol (414  $\mu\text{g}$  /Kg de peso corporal), es capaz de inhibir el estrés oxidativo inducido en los animales de experimentación al convertirlos en fumadores pasivos. Se detecta una disminución en las excreciones urinarias del  $\text{F}_2$ -isopropano-8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , producto no enzimático proveniente de la oxidación del ácido araquidónico, que es considerado uno de los mejores marcadores del estrés oxidativo *in vivo* [223].

Estos estudios también se han realizado en humanos, observándose una inhibición dependiente de la dosis de la excreción del  $\text{F}_2$ -isopropano-8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  en voluntarios a los que se les ha suministrado aceite de oliva enriquecido con cierta cantidad de compuestos fenólicos [224].

Estos estudios han permitido establecer que la cantidad de isoprostanos excretados por la orina es inversamente proporcional a la cantidad de alcohol homovanílico cuantificado en plasma, que a su vez es un derivado metabólico del hidroxitirosol formado mediante la enzima catecol-O-fenil-transferasa. De aquí se deduce que los compuestos fenólicos del aceite de oliva, concretamente los metabolitos del hidroxitirosol, alcanzan los compartimentos celulares en donde puede ejercer su actividad antioxidante.

La eficacia de los fenoles del aceite de oliva en la prevención de la oxidación de la LDL ha abierto las expectativas sobre el interés de obtener extractos fenólicos para su uso como profilácticos frente a la aterosclerosis. Los primeros estudios llevados a cabo por Visioli en 1999 [225], utilizaron como fuente para la obtención de los extractos las aguas de lavado procedentes del proceso de obtención del aceite de oliva. Los resultados mostraron que los extractos eran capaces de inhibir la oxidación de la LDL mediante la reducción del anión superóxido y el hipoclorito a concentraciones de hasta 20 ppm. Incluso, algunos de estos extractos, inhibían la producción de leucotrienos, producidos por los neutrófilos humanos, siendo los extractos más efectivos los que tenían una mayor concentración de fenoles simples como el hidroxitirosol, en relación con los extractos con una mayor concentración de derivados de oleuropeína [225].

Recientemente [226] Covas y col. (2006), en el marco del proyecto EUROLIVE, llevaron a cabo un estudio *in vivo* en el que analizaron diversos parámetros relacionados con el estado oxidativo de las LDL durante el periodo posprandial después de una ingesta aguda de 40 mL de aceite. Analizaron tirosol, hidroxitirosol y alcohol homovainílico en plasma, encontrando una concentración máxima de estos compuestos entre las 0.7 y 1.3 horas después de la ingesta, siendo máxima la concentración de fenoles en el plasma de los individuos que habían ingerido aceite con mayor contenido fenólico. Por otra parte, el contenido en fenoles en las LDL de los individuos que consumieron el aceite más rico en fenoles también experimentó un incremento después de la ingesta. Otros marcadores del estado de oxidación de las LDL mostraron que los cambios posprandiales en LDL oxidadas *in vivo* muestran una relación dosis dependiente con la concentración de fenoles en el aceite ingerido.

Ruano y col., (2007)[227], considerando que el estrés oxidativo asociado con la lipemia posprandial contribuye a la disfunción endotelial que podría alcanzar un estado trombogénico, plantearon un estudio orientado a establecer la relación entre el efecto de la ingesta de aceite de oliva virgen rico en fenoles con la mejora del perfil protrombótico posprandial asociado a una ingesta aguda de grasa. Los resultados mostraron evidencias de una mejora del dicho perfil.

#### 4.4.2.1.1 Otras propiedades biológicas de la fracción fenólica del aceite de oliva relacionadas con la aterosclerosis.

Además de poseer actividad antioxidante, los fenoles del aceite de oliva presentan otras cualidades biológicas que les hacen participar en la protección de la salud humana. Experimentos *in vitro* con varios modelos celulares, plaquetas, leucocitos y macrófagos, han servido para demostrar la capacidad de algunos fenoles para modular la expresión o actividad de ciertos enzimas. Esto es posible gracias al carácter anfipático de estos compuestos, que les

confiere una solubilidad adecuada tanto en fase acuosa como en fase lipídica, pudiendo acceder a los sistemas enzimáticos independientemente del medio que les rodea[86] .

Según Petroni y col.(1995)[228], el hidroxitirosol inhibe la formación de los eicosanoides proinflamatorios, el leucotrieno B4 y el tromboxano B2, de forma dosis dependiente. En menor grado lo hacen también la oleuropeína y los flavonoides, luteolina, apigenina y quercetina. Por su parte de la Puerta [229], observaron que no sólo el hiroxitirosol, sino también el tirosol, la oleuropeína y el ácido cafeíco inhiben la formación de estos inductores de la agregación plaquetaria mediante la reducción del enzima 5-lipooxigenasa y la araquidonatodeshidrogenasa [222, 230].

Se ha estudiado la intervención de éstos fenoles en los procesos de formación de óxido nítrico. El óxido nítrico actúa como citostático o citotóxico frente a algunos patógenos, como el *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania major* y *Toxoplasma gondii* entre otras. Además de estos efectos antimicrobianos, se han otorgado también efectos antitumorales, inhibición de la agregación plaquetaria y mantenimiento de la perfusión durante la vasorelajación.

Si en una célula inmunocompetente, como es el caso de los macrófagos, se induce la producción de óxido nítrico mediante lipopolisacáridos bacterianos y se añade oleuropeína, la producción del oxido nítrico se incrementa en un 58.7%. Este aumento es debido al efecto tónico directo de la oleuropeína sobre la expresión y actividad de la enzima sintasa de óxido nítrico constitutiva. Este hecho se ha demostrado mediante análisis por “Western-blot”, empleando un inhibidor del enzima, el ester metílico de la L-nitrometilarginina [231].

Se sabe que la inhibición de la síntesis de oxido nítrico incrementa el daño celular y la mortalidad animal [232], además de ofrecer el oxido nítrico macrofágico una función protectora frente a la oxidación de las LDL, que puede darse en las áreas de inflamación como consecuencia de un aumento de la producción de reactivos oxigenados[233, 234].

#### **4.5 LA ACTUALIDAD EN EL ÁREA DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES: PERFILES NUTRICIONALES, DECLARACIONES NUTRICIONALES Y DECLARACIONES DE SALUD.**

Hasta la aparición de la legislación actual, la legislación para alimentos funcionales en la última década tuvo que apoyarse en el **Reglamento (CE) n° 258 / 97** del Parlamento Europeo y del Consejo, emitido el 27 de enero de 1997 sobre nuevos ingredientes y alimentos, pese a no tratarse de un reglamento específico de propiedades saludables. Pero la falta de un reglamento específico provocaba que las declaraciones o alegaciones relacionadas con la salud en los alimentos siguieran creando una situación de incertidumbre en el área de salud. Al mismo tiempo, aumentaban las expectativas de desarrollo en el sector I+D+i alimentario, se continuaba necesitando mejorar la competitividad en la industria agroalimentaria y la comercialización de los alimentos también debía ser optimizada. Por todo ello, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA *European Food Safety Authority*) planteó la elaboración de un reglamento que permitiera legislar y con ello solucionar toda esta problemática. Su cumplimiento garantizaría la libre circulación de los alimentos, evitando así la competencia desleal en el mercado interior y un nivel elevado de protección de los consumidores, facilitándoles la adecuada elección de los alimentos.

Fue este organismo el que elaboró el Reglamento CE n° 1924/2006 (modificado por 107/2008 y 109/2008), relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos, que se encuentra en vigor desde el 1 de Julio del 2007. Durante la redacción de este documento se tuvo muy presente la gran importancia que suponía el etiquetado, la presentación, la publicidad y la promoción de los alimentos, así como la falta de reglamentación en esta área de la industria alimentaria. Con este reglamento se pretende armonizar a escala comunitaria lo que se consideran declaraciones nutricionales y de salud, las cuales deben estar basadas en pruebas científicas generalmente aceptadas y ser bien comprendidas por el consumidor medio.

Se entiende por **declaración** cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas. En el artículo 2 se definen tres tipos de declaraciones: nutricionales, de propiedades saludables y de reducción de riesgo de enfermedad.

- Una **declaración nutricional** es cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas con motivo del aporte energético proporcionado, proporcionado en un grado reducido o incrementado o no proporcionado y/o de los nutrientes u otras sustancias que contiene, contiene en proporciones reducidas o incrementadas o no contiene (Art. 2.4). En la tabla I. 5 se recogen todas las declaraciones nutricionales permitidas y sus condiciones de aplicación.

- Las **declaraciones de propiedades saludables** son cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud (Art. 2.5).
- Las declaraciones sobre **la reducción de riesgo de enfermedad** son cualquier declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana (Art. 2.6)

**Tabla I. 4.** Declaraciones nutricionales permitidas y sus condiciones de aplicación.

CONCEPTO	ALEGACIÓN		
	<i>Bajo contenido</i>	<i>Contenido reducido</i>	<i>Sin</i>
<b>VALOR ENERGÉTICO</b>	< 40 kcal (170 kJ)/100 g <20 kcal (80 kJ)/100 ml	Inferior al 30 % del original	< 4 kcal (17 kJ)/100 ml.
	<i>Bajo contenido</i>		<i>Sin</i>
<b>GRASA</b>	< 3 g de grasa por 100 g < 1,5 g de grasa por 100 ml < 1,8 g de grasa por 100 ml leche semidesnatada		< 0,5 g de grasa por 100 g o 100 ml.
<b>GRASA SATURADA</b>	Suma de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos <i>trans</i> : < 1,5 g/100 g < 0,75 g/100 ml  Suma de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos <i>trans</i> <10% % del valor energético.		Suma de grasas saturadas y de ácidos grasos <i>trans</i> < 0,1 g por 100 g o 100 ml.
<b>AZÚCARES</b>	< 5 g de azúcares por 100 g < 2,5 g de azúcares por 100 ml		< 0,5 g de azúcares por 100 g < 0,5 g de azúcares por 100 ml
	<i>Bajo contenido</i>	<i>Muy bajo contenido</i>	<i>Sin</i>
<b>SODIO/SAL</b>	< 0,12 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g o por 100 ml	< 0,04 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g o por 100 ml	< 0,005 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g o por 100 ml
	<i>Fuente de</i>	<i>Alto contenido</i>	
<b>FIBRA</b>	> 3 g de fibra por 100 g >1,5 g de fibra por 100 kcal		> 6 g de fibra por 100 g > 3 g de fibra por 100 kcal

<b>PROTEÍNAS</b>	>12% de la energía total	<b>&gt; 20% de la energía total</b>	
	<i>Fuente de</i>	<i>Alto en</i>	
<b>VITAMINAS Y MINERALES</b>	≥ 15 de la CDR	≥ 30 de la CDR	
	<i>Contiene</i>	<i>Mayor contenido</i>	<i>Contenido reducido</i>
<b>NUTRIENTES (U OTRAS SUSTANCIAS)</b>	Si el producto cumple todas las disposiciones aplicables previstas en el presente Reglamento, y en particular en el artículo 5. Por lo que respecta a las vitaminas y minerales, se aplicarán las condiciones correspondientes a la declaración «fuente de».	El producto cumple las condiciones de «fuente de» y el incremento de su contenido es > 30 % en comparación con un producto similar.	<b>Contenido está reducido más del 30 % en comparación con un producto similar, excepto para micronutrientes, en los que será admisible una diferencia del 10 % en los valores de referencia así como para el sodio, o el valor equivalente para la sal, en que será admisible una diferencia del 25 %.</b>
	<i>Light/Lite</i>		
<b>ENERGÍA</b>	Las mismas condiciones que las establecidas para el término «contenido reducido»; asimismo, la declaración deberá estar acompañada por una indicación de la característica o características que hacen que el alimento sea «light» o «lite» (ligero).		

En los tres casos, el nutriente o sustancia acerca de la cual se hace la declaración debe estar contenido en el producto final en una cantidad significativa con la cual produzca el efecto declarado de forma representativa en la población y en una forma asimilable por el organismo. Este efecto además, siempre debe quedar establecido a través de pruebas científicas aceptadas de forma consensuada, las cuales pueden ir acompañadas de una solicitud de protección de datos sujetos a derechos de propiedad industrial (**Artículo 18**). Por otro lado, la cantidad de producto que cabe razonablemente esperar que se consuma debe proporcionar la cantidad significativa de nutriente o sustancia sobre la cual se declara el efecto nutricional o fisiológico. Por supuesto el efecto benéfico debe ser relevante para la salud humana.

Por el contrario, estas no podrán ser falsas, ambiguas o engañosas. No podrán dar lugar a dudas sobre la seguridad y/o la adecuación nutricional de otros alimentos, así como alentar o aprobar el consumo excesivo de un alimento. No podrán hacer referencia a recomendaciones de

médicos individuales u otros profesionales de la salud. Tampoco podrán sugerir que una dieta equilibrada y variada no puede proporcionar todos los nutrientes necesarios, ni afirmar, sugerir o implicar que el alimento tiene propiedades de prevención, tratamiento o curación de una enfermedad humana. Por último, ninguno de los tres tipos de alegaciones podrá referirse a cambios en las funciones corporales con términos o representaciones alarmistas.

El Reglamento 1924/2006 también regula las condiciones de uso y los procedimientos para conseguir la autorización para el uso de declaraciones nutricionales y declaraciones de propiedades saludables distintas de las relacionadas con reducir el riesgo de enfermedades y relativas al desarrollo y la salud de los niños (Artículo 13) y las declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad y declaración relativas al desarrollo y salud de los niños (Artículo 14).

Básicamente, las declaraciones se referirán a que un nutriente o una sustancia ejerzan una función en el crecimiento, desarrollo y funciones corporales, así como en las funciones psicológicas y de comportamiento. También se incluirán nutrientes o alimentos que faciliten el adelgazamiento, el control de peso, la disminución de la sensación de hambre, el aumento de la sensación de saciedad y la reducción del aporte energético en la dieta, aunque en estas alegaciones nunca se indicará la magnitud o ritmo de la pérdida de peso.

La EFSA, que engloba al grupo científico encargado de los productos dietéticos, la nutrición y las alergias (NDA), será el encargado de evaluar el fundamento científico de estas declaraciones, las cuales primero están recogidas en una preclasificación realizada por los Estados miembros y la Comisión. Para lograr su cometido, dejaron fijados los criterios básicos para garantizar la completa y coherente selección de las declaraciones.

Debido al alto número de declaraciones de salud recibidas por la EFSA en los últimos años existe la probabilidad de que no se pueda entregar a la Comisión el dictamen sobre la lista prevista en el **artículo 13** en el plazo estimado, pudiendo retrasarse al 2010.

La autorización de declaraciones relativas al desarrollo y la salud de los niños vendrá regulada conforme al procedimiento establecido para las declaraciones de reducción de riesgo de enfermedad, recogidas en el artículo 14. En cuanto a las declaraciones sobre la reducción de riesgo de enfermedad, los solicitantes deberán aportar información que demuestre perfectamente la relación de causalidad. La EFSA irá aprobando caso por caso cada una de este tipo de alegaciones.

Pero no todos los alimentos podrán utilizar una declaración nutricional. El artículo 4 del reglamento señala que los alimentos promocionados con declaraciones van a ser percibidos por los consumidores como alimentos con ventajas nutricionales, fisiológicas o de otro tipo para la salud respecto a otros productos similares o distintos a los que no se atribuyan declaraciones. Por tanto, para que un alimento pueda presentar alegaciones de salud primero debe **ajustarse a unos perfiles nutricionales**, teniendo en cuenta las cantidades de determinados nutrientes y otras sustancias que contenga, como por ejemplo grasas, ácidos grasos saturados, ácidos grasos *trans*, azúcares y sal o sodio.

El uso de los perfiles nutricionales pretende evitar una situación en la que las declaraciones nutricionales o de salud podrían inducir a error a los consumidores sobre la calidad nutricional de un producto alimentario cuando se trata de tomar decisiones saludables en el contexto de una dieta equilibrada. Por ello, la industria agroalimentaria podrá incluir este tipo de información siempre que los productos no sobrepasen las cantidades de sal, grasa o azúcar fijadas en el llamado «perfil nutricional», si lo hicieran en alguno de los casos y no en los otros, debería indicarse.

En Enero de 2008, el Grupo de Expertos en Productos dietéticos, nutrición y alergias de la EFSA publicó el documento *“The setting of nutrient profiles for foods bearing nutrition and health claims pursuant to article 4 of the regulation (EC) nº 1924”* (FSA-Q-2007-058) con los resultados de la negociación para el establecimiento de perfiles nutricionales. Para establecer estos perfiles se tuvo en cuenta el rol de la dieta, los diferentes grupos de alimentos existentes y la contribución de los nutrientes a la dieta total de la población, dándole una gran importancia a aquellos grupos de alimentos que contribuyen significativamente a la dieta de las personas, entre otros, los aceites, los productos lácteos, los cereales y las frutas. Además, se contaba con una herramienta fundamental, el etiquetado, en el que se ofrece la información sobre los contenidos de nutrientes y sustancias con efecto nutricional. En la UE había hasta ahora un vacío sobre cuál debía ser el contenido de estas sustancias, especialmente de grasas, grasas saturadas, ácidos grasos *trans*, sal o sodio, y azúcares, para los que no se recomiendan ingestas excesivas en la dieta total, así como grasas poliinsaturadas y monoinsaturadas, hidratos de carbono distintos de los azúcares, vitaminas, minerales, proteínas y fibras. Estos son los nutrientes para los que existen evidencias de desequilibrio en la dieta de la población de la UE, es decir, aquellos que podrían influir en el desarrollo de sobrepeso y obesidad u otras enfermedades relacionadas con la dieta como enfermedades cardiovasculares, bien sea por el consumo en exceso o por una ingesta insuficiente.

Dentro de este apartado se consideró la posibilidad de admitir una serie de excepciones, permitiéndose la solicitud de alegaciones de salud a determinados alimentos que no cumplen los requisitos exigidos sobre perfil nutricional, pero sobre los que existen numerosas pruebas científicas que avalan sus propiedades saludables. Entre las excepciones destaca el **aceite de oliva**. Se considera que las grasas monoinsaturadas son beneficiosas, pero sólo si se encuentran en más de un 45% de la cantidad total de ácidos grasos y además, la cantidad de grasa saturada no proporciona más de un 10% de la energía. Bajo esta premisa, el aceite de oliva no podría obtener la alegación de “Alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados”. El comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición propone como solución que la limitación no sea el % de saturados si no una relación monoinsaturados/saturados superior a 4.5 (AESAN- 2006-04).

Pero para el aceite de oliva se debería conseguir alguna otra alegación basada en su fracción no glicérida, principalmente por su contenido en determinados compuestos fenólicos. De hecho, hay varias solicitudes en estudio por parte de la EFSA que se resumen a continuación, se debe tener en cuenta que estas solicitudes todavía no están aprobadas y es ahora cuando empiezan a surgir las primeras decisiones:



- A groso modo se desea que sean reconocidas las siguientes propiedades relacionadas con el **olivo y todo lo que de él derive**: contribuir con las defensas del organismo contra los agentes externos, favorecer al sistema respiratorio, regular el correcto funcionamiento del tracto gastrointestinal, la acción antioxidante, la regulación positiva de la presión sanguínea y de los niveles de azúcares en el organismo.
- A nivel del **aceite de oliva en su conjunto**, se alega que posee propiedades antioxidantes con las que reduce el estrés oxidativo. Además, junto con el aceite de orujo de oliva presentan acciones reguladoras beneficiosas en el sistema cardiovascular, protegiendo a este nivel la salud en toda la población en general que lo consume. Por ejemplo, mejora el perfil lipídico en sangre con lo que repercute positivamente sobre la salud cardiovascular y regula el nivel de glucosa en sangre. Todo ello debido a las peculiaridades en su composición, en especial para el aceite de oliva virgen extra.
- Determinados **extractos del fruto del olivo** puede influenciar en el metabolismo de las grasas a nivel de la etapa de almacenamiento en adipocitos, induciendo a una pérdida de peso corporal.
- El **extracto de las hojas del olivo, ricos en oleuropeína**, puede ayudar a regular la presión sanguínea. A su vez se considera un antioxidante natural con capacidad de proteger al organismo del daño oxidativo. Además, el extracto de hoja de olivo junto con un extracto de Melisa enriquecido con monoestearato de ácido láurico presenta funciones inmunológicas.
- A nivel de compuestos, por un lado los **polifenoles de la oliva**, del aceite de oliva y del alpechín pueden regular el metabolismo de los lípidos, gracias al hecho de ser absorbidos y metabolizados en el intestino, tras lo cual se combinarán con las LDL y ejercerán un efecto antioxidante. Por ello, a su vez podrán ayudar a mantener los niveles saludables de colesterol-LDL y evitar la oxidación lipídica. En concreto **el hidroxitirosol y la oleuropeína**, por su poder antioxidante, actúan protegiendo del daño oxidativo al colesterol LDL, así como a otras células del organismo.

Por otro lado **el Omega 6** (Ácido linolénico) presente en el aceite de oliva es un nutriente beneficioso para la piel, sugiriéndose que una ingesta apropiada de aceite de oliva disminuiría el daño actínico cutáneo.

- El **suplemento alimentario "Olive biophenol"** es una potente fuente de fenoles antioxidantes que colaboran con el sistema inmune frente a los radicales libres. Este suplemento puede emplearse en cualquier grupo de población incluyendo niños y adultos. Asimismo, presenta propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, propiedades protectoras de los daños causados por las radiaciones ultravioleta y propiedad antienvjecimiento muy importante.

## 4.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez de Sotomayor MH, Pérez -Guerrero C, Marhuenda E.: *Interés terapéutico de las estatinas en el tratamiento de la aterosclerosis*. Ars Pharmaceutica. **1999**, 40(4): 217-231
2. Chang JY and Liu L-Z: *25-Hydroxycholesterol causes death but does not prevent nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells*. Neurochemistry International. **1997**, 31(4): 517-523.
3. Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, et al.: *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil*. Journal of Chromatography A. **2004**, 1054(1-2): 113-127.
4. Graciani Constante E: *Characterization of Spanish virgin olive oil. III. Possibility of characterization of varieties and growing zones on the basis of triacylglycerol content*. Grasas y Aceites (Sevilla, Spain). **1988**, 39(2): 105-10.
5. Romero MP, Tovar MJ, Ramo T, and Motilva MJ: *Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin "les garrigues"*. J. Journal of the American Oil Chemists' Society. **2003**, 80(5): 423-430.
6. Beltran G, Del Rio C, Sanchez S, and Martinez L: *Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual*. Journal of agricultural and food chemistry. **2004**, 52(11): 3434-40.
7. Beltran G, Aguilera MP, Del Rio C, Sanchez S, et al.: *Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils*. Food Chemistry. **2005**, 89(2): 207-215.
8. Mataix Verdú FMDV, E: *El aceite de oliva, Bases para el futuro*, ed. EDPd Jaén. **1988**, Jaén, España.
9. Harborne JB and Editor: *Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1: Plant Phenolics*. **1989**. 552 pp.
10. Bravo L and Saura-Calixto F: *Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace*. American Journal of Enology and Viticulture. **1998**, 49(2): 135-141.
11. Wheldale M: *The anthocyanin pigments of plants*. **1916**., London. p. 124-125
12. Harborne JB: *Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants*. Recent Advances in Phytochemistry. **1979**, 12(Biochem. Plant Phenolics): 457-74.
13. Butler LG and Rogler JC: *Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins*. ACS Symposium Series. **1992**, 506(Phenolic Compd. Food Their Eff. Health I): 298-304.
14. Davin LB LN: *Phenylpropanoid metabolism: biosynthesis of monolignols, lignans, and neolignans, lignins and suberins*. Phenolic metabolism in plants, ed. IR Stafford HA, eds. Vol. 26. **1992**, New York. 325±375.
15. Parr AJ BG: *Phenols in plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile*. Journal of the Science of Food and Agriculture. **2000**, 80: 985-1012.

16. Cuadra P, Harborne JB, and Waterman PG: *Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in Gnaphalium luteo-album in response to UV-B radiation*. *Phytochemistry* **1997**, 45(7): 1377-1383.
17. K.Hahlbrock DS: *Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **1989**, 40: 347-369.
18. Raskin I: *Role of salicylic acid in plants*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **1992**, 43: 439-63.
19. Teutonico RA, Dudley MW, Orr JD, Lynn DG, et al.: *Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures*. *Plant Physiology*. **1991**, 97(1): 288-97.
20. Gutierrez-Rosales F, Rios JJ, and Gomez-Rey ML: *Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51(20): 6021-6025.
21. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, et al.: *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. *American Journal of Clinical Nutrition*. **2004**, 79(5): 727-747.
22. Gerber M: *Biofactors in the Mediterranean diet*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **2003**, 41(8): 999-1004.
23. Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, et al.: *International conference on the healthy effect of virgin olive oil*. *European journal of clinical investigation*. **2005**, 35(7): 421-4.
24. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, et al.: *Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors - A randomized trial*. *Annals of Internal Medicine*. **2006**, 145(1): 1-11.
25. Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, et al.: *Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients*. *European Journal of Nutrition*. **2005**, 44(2): 121-127.
26. Artajo LS, Romero MP, and Motilva MJ: *Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2006**, 86(4): 518-527.
27. Montedoro G: *Analytical investigations on the phenolic constituents present in olive oils in relation to the characteristics of the fruit, their role in stability to oxidation, and their interference in determination the peroxide number*. *Annali della Facolta di Agraria, Universita degli Studi di Perugia*. **1973**, 28, Pt. 1: 97-116.
28. Angerosa F, Mostallino R, Basti C, and Vito R: *Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils*. *Food Chemistry*. **2000**, 72(1): 19-28.
29. Cantarelli C: *The polyphenols of olives and olive oils*. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. **1961**, 38: 69-72.
30. Montedoro G: *Phenolic constituents present in virgin olive oil. Note I. Identification of some phenolic acids and their antioxidant power*. *Scienza e Tecnologia degli Alimenti*. **1972**, 2(3): 177-86.
31. Ragazzi E and Veronese G: *Phenolic components of olive oils*. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. **1973**, 50(12): 443-52.

32. Vazquez Roncero A, Janer Del Valle C, and Janer Del Valle ML: *Phenolic compounds in olive fruits. III. Polyphenols in olive oil*. Grasas y Aceites (Sevilla, Spain). **1976**, 27(3): 185-91.
33. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, and Miniati E: *Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1992**, 40(9): 1577-80.
34. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, and Miniati E: *Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1992**, 40(9): 1571-6.
35. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E, et al.: *Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil: Chemical, biochemical and nutritional aspects*. Bulletin de Liaison - Groupe Polyphenols. **1992**, 16(Pt. 2): 183-6.
36. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, et al.: *Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1993**, 41(11): 2228-34.
37. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, et al.: *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil*. Clinical Chemistry (Washington, D. C.). **2000**, 46(7): 976-988.
38. Brenes M, Hidalgo FJ, Garcia A, Rios JJ, et al.: *Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **2000**, 77(7): 715-720.
39. Cartechini AP, P.; Famiani, F.; Tombesi, A: *Maturazione delle olive e qualità dell'olio delle cultivar mignolia et orbetana*. , ed. AFA Univ. Vol. Vol. XLV. **1991**, Perugia. 249-259.
40. Stefanoudaki EK, A.: *Qualitative characteristics of Cretan olive oil*. Olivae. **1995**, 56(51).
41. Gutiérrez FJ, B.; Ruíz, A.; Albi, M.A. : . *Effect of olive ripeness on the oxidative stability pf virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1999**, 47: 121-127.
42. Gutiérrez-Rosales FR, J.J.; Gómez-Rey, M.L. : *Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. . Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2003** 51: 6021-6025.
43. Motilva MJT, M.J.; Romero, M.P.; Alegre, S.; Girona, J. : *Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive stress (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period*. Journal of the Science of Food and Agriculture. **2000**, 80: 2037-2043.
44. Tovar MJ, Motilva MJ, Luna M, Girona J, et al.: *Analytical characteristics of virgin olive oil from young trees (Arbequina cultivar) growing under linear irrigation strategies*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **2001**, 78(8): 843-849.
45. Sánchez-Casas JJDMG, C.; Marín expósito, J.: *La calidad del aceite de oliva procedente de variedades cultivadas en extremadura en relación con la composición y maduración de la aceituna*. Olivae. **1999** 75: 31-36.

46. Beltrán GA, M.P.; del Río, C.; Sánchez, S.; Martínez, L.: *Influencia del proceso de maduración del fruto de diferentes variedades de olivo sobre el contenido de antioxidantes naturales del aceite de oliva virgen*. En “*Maduración y Post-recolección de frutos y hortalizas*”. CSIC. Biblioteca de Ciencias, ed. Edición. Vol. 12. 2003 Madrid. 99-104.
47. Gutierrez FP, S.; Garcia, J. M.; Castellano, J. M. : *Quality of oils from olives stored under controlled atmosphere*. . Journal of The American Oil Chemists' Society. 1992 69 . 1215-1218.
48. Servili MM, G. : *Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality*. European Journal of Lipid Science and Technology. 2002 104: 602-613.
49. Artajo LSM, M.J.; Romero, M.P. . *Perfil cromatográfico de la fracción fenólica en las fases del proceso de extracción de aceite de oliva: uso de coadyuvantes (microtálco natural MNT)*. in *Proceedings in III Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*. 2004. Pamplona.
50. Ranalli A: *Aspectos y problemas relacionados con el almacenamiento y la conservación del aceite de oliva*. Olivae, . 1989 6(27): 11-18.
51. Solinas M and Cichelli A: *Determination of phenolic substances in olive oil*. Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione. 1981, 10(3): 159-64.
52. Cortesi N and Fedeli E: *Polar components of virgin olive oil. I*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. 1983, 60(6): 341-51.
53. Solinas M: *HRGC analysis of phenolic components in virgin olive oils in relation to the ripening and the variety of olives*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. 1987, 64(7): 255-62.
54. Tsimidou M, Lytridou M, Boskou D, Pappa-Louisi A, et al.: *On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RP-HPLC*. Grasas y Aceites (Seville). 1996, 47(3): 151-157.
55. Mannino S, Cosio MS, and Bertuccioli M: *High-performance liquid chromatography of phenolic compounds in virgin olive oils using amperometric detection*. Italian Journal of Food Science. 1993, 5(4): 363-70.
56. Carrasco Pancorbo A, Cruces-Blanco C, Segura Carretero A, and Fernandez Gutierrez A: *Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis*. Journal of agricultural and food chemistry. 2004, 52(22): 6687-93.
57. Suarez M, Macia A, Romero M-P, and Motilva M-J: *Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil*. Journal of Chromatography, A. 2008, 1214(1-2): 90-99.
58. Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ, et al.: *Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999, 47(9): 3535-3540.
59. Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Rios JJ, et al.: *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. 2001, 49(5): 2185-2192.
60. Bianco A, Mazzei RA, Melchioni C, Romeo G, et al.: *Microcomponents of olive oil-III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol* Food Chemistry. 1998, 63(4): 461-464.
61. Caruso D, Colombo R, Patelli R, Giavarini F, et al.: *Rapid Evaluation of Phenolic Component Profile and Analysis of Oleuropein Aglycon in Olive Oil by Atmospheric*

- Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry (APCI-MS)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2000**, 48(4): 1182-1185.
62. Visioli F and Galli C: *Extra-virgin olive oil is a source of bioactive compounds*. Cardiovascular Reviews & Reports. **2002**, 23(7): 389-392.
  63. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, et al.: *Olive oil phenols are absorbed in humans*. Journal of Nutrition. **2002**, 132(3): 409-417.
  64. de la Torre-Carbot K, Jauregui O, Gimeno E, Castellote AI, et al.: *Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(11): 4331-4340.
  65. Christophoridou S and Dais P: *Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Analytica Chimica Acta. **2009**, 633(2): 283-292.
  66. Lundquist K and Stomberg R: *On the Occurrence of Structural Elements of the Lignan Type (Beta-Beta-Structures) in Lignins - the Crystal-Structures of (+)-Pinoresinol and (+)-Trans-3,4-Divanillyltetrahydrofuran*. Holzforschung. **1988**, 42(6): 375-384.
  67. Bianco A, Buiarelli F, Cartoni G, Coccioli F, et al.: *Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in olives and oils*. Analytical Letters. **2001**, 34(6): 1033-1051.
  68. Servili M, Baldioli M, Mariotti F, and Montedoro GF: *Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: Distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during the oil mechanical extraction process*. Acta Horticulturae. **1999**, 474(Vol. 2, Third International Symposium on Olive Growing, 1997): 609-613.
  69. E C: *Basic mechanisms of antioxidant activity* BioFactor. **1997**, 6(4): 391-397.
  70. Boland JL. t-HP: *Kinetics in the chemistry of rubber and related materials; the inhibitory effect of hidroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate*. Transactions of the Faraday Society. **1947**, 43: 201-204.
  71. Nawar WW: *Lipids, in Food Chemistry*. Fennema O.R. Ed., ed. r Ed. **1996**, New York: Marcel Dekker Inc. 225-319.
  72. Sherwin ER: *Oxidation and antioxidants in fat and oil processing*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **1978**, 55(11): 809-14.
  73. Chimi H, Cillard J, Cillard P, and Rahmani M: *Peroxy and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **1991**, 68(5): 307-12.
  74. Hudson BJB and Lewis JI: *Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity*. Food Chemistry. **1983**, 10(1): 47-55.
  75. RiceEvans CA, Miller J, and Paganga G: *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science. **1997**, 2(4): 152-159.
  76. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, et al.: *Inhibition of Platelet-Aggregation and Eicosanoid Production by Phenolic Components of Olive Oil*. Thrombosis Research. **1995**, 78(2): 151-160.
  77. Marinova EM and Yanishlieva NV: *Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **1994**, 71(4): 427-34.

78. Nawar WW: *Physical state and the oxidative/antioxidative balance*. Oils-Fats-Lipids 1995, Proceedings of the World Congress of the International Society for Fat Research, 21st, The Hague, Oct. 1-6, 1995. **1996**, 2: 349-350.
79. Belitz HD, & Grosch, W. 2nd ed . *Food chemistry*, ed. IHDBWG (Eds.). **1987**, Berlin, German: Springer-Verlag. 317–318.
80. Ramanathan L and Das NP: *Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1992**, 40(1): 17-21.
81. Hayes RE, Bookwalter GN, and Bagley EB: *Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - a review*. Journal of Food Science. **1977**, 42(6): 1527-32.
82. Roberfroid MB: *Concepts and strategy of functional food science: the european perspective*. American Journal of Clinical Nutrition. **2000**, 71(6, Suppl.): 1660S-1664S.
83. Larrosa M, Llorach R, Espin JC, and Tomas-Barberan FA: *Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie. **2002**, 35(6): 532-542.
84. Pszczola D: *“How Functionality Helps Address the Health Initiative.”* Food Technology. **2003**, 57: 72–101.
85. Liu RH: *Protective role of phytochemicals in whole foods: implications for chronic disease prevention*. Applied Biotechnology, Food Science and Policy. **2003**, 1(1): 39-46.
86. Aruoma OI, Cuppett SL, and Editors: *Antioxidant Methodology: In Vivo and In Vitro Concepts*. : AOCs Press. **1997**. 241 pp.
87. Prior RL, Wu X, and Schaich K: *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(10): 4290-4302.
88. Schlesier K, Harwat M, Bohm V, and Bitsch R: *Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods*. Free Radical Research. **2002**, 36(2): 177-187.
89. Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, et al.: *The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers*. European journal of clinical nutrition. **1998**, 52(10): 733-6.
90. Serafini M, Maiani G, and Ferro-Luzzi A: *Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans*. Journal of Nutrition. **1998**, 128(6): 1003-1007.
91. Laeubli MW, Bruttel PA, and Schalch E: *Determination of the oxidative stability of fats and oils - comparison between the active oxygen (AOM) and rancimat methods*. Fett Wissenschaft Technologie. **1988**, 90(2): 56-8.
92. Artajo LS, Romero MP, Morello JR, and Motilva MJ: *Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds: Evaluation of Their Antioxidant Activity and Their Effect on the Bitter Index*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54(16): 6079-6088.
93. Ou B, Hampsch-Woodill M, and Prior RL: *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2001**, 49(10): 4619-4626.
94. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, et al.: *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. **2002**, 50(16): 4437-4444.

95. Benzie IFF and Strain JJ: *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Analytical Biochemistry. **1996**, 239(1): 70-76.
96. O'Brien NM, Woods JA, Aherne SA, and O'Callaghan YC: *Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals*. Biochemical Society Transactions. **2000**, 28(2): 22-26.
97. Glei M, Matuschek M, Steiner C, Bohm V, et al.: *Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells*. Toxicology in Vitro. **2003**, 17(5/6): 723-729.
98. Liu RH and Finley J: *Potential Cell Culture Models for Antioxidant Research*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(10): 4311-4314.
99. Alia M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, et al.: *Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2)*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. **2005**, 19(2): 119-128.
100. Collins AR: *Assays for oxidative stress and antioxidant status: Applications to research into the biological effectiveness of polyphenols*. American Journal of Clinical Nutrition. **2005**, 81(1S): 261S-267S.
101. Lampe JW: *Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies*. American Journal of Clinical Nutrition. **1999**, 70(3, Suppl.): 475S-490S.
102. Prior RL: *Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage*. American Journal of Clinical Nutrition. **2003**, 78(3, Suppl.): 570S-578S.
103. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, et al.: *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. American Journal of Clinical Nutrition. **2005**, 81(1S): 230S-242S.
104. Nigdikar SV WN, Griffin BA, Howard AN: *Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo*. Am J Clin Nutr. **1998**, 68: 258-265.
105. Lamuela-Raventos RM, Covas M-I, Fito M, Marrugat J, et al.: *Detection of dietary antioxidant phenolic compounds in human LDL*. Clinical Chemistry (Washington, D. C.). **1999**, 45(10): 1870-1872.
106. Cerda B, Espin JC, Parra S, Martinez P, et al.: *The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans*. European Journal of Nutrition. **2004**, 43(4): 205-220.
107. Ichiyonagi T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, et al.: *Metabolic Pathway of Cyanidin 3-O-beta -D-Glucopyranoside in Rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(1): 145-150.
108. Mayne ST: *Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research*. Journal of Nutrition. **2003**, 133(3S): 933S-940S.
109. Sestili P and Cantoni O: *Osmotically driven radial diffusion of single-stranded DNA fragments on an agarose bed as a convenient measure of DNA strand scission*. Free Radical Biology & Medicine. **1999**, 26(7/8): 1019-1026.



110. Halliwell B and Whiteman M: *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?* British Journal of Pharmacology. **2004**, 142(2): 231-255.
111. Griffiths HR ML, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB: *Biomarkers*. Medicina clinica. **2000**, 23: 101-208.
112. Parada J and Aguilera JM: *Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients*. Journal of Food Science. **2007**, 72(2): R21-R32.
113. Duthie GG, Gardner PT, and Kyle JAM: *Plant polyphenols: are they the new magic bullet?* Proceedings of the Nutrition Society. **2003**, 62(3): 599-603.
114. Martinez-Valverde I, Periago MJ, and Ros G: *Nutritional significance of phenolic compounds in the diet*. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. **2000**, 50(1): 5-18.
115. Kuhnau J: *The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition*. World review of nutrition and dietetics. **1976**, 24: 117-91.
116. Hammerstone JF and Lazarus SA: *HPLC-MS analysis of flavonoids in foods and beverages*. ACS Symposium Series. **2000**, 754(Caffeinated Beverages): 374-384.
117. Tuck KL and Hayball PJ: *Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects*. Journal of Nutritional Biochemistry. **2002**, 13(11): 636-644.
118. Vazquez CM, Lopez MR, Bravo L, and Ruiz-Gutierrez V: *Comparison of effects of two different monounsaturated oils on biliary secretion in rats*. Nutrition Research (New York). **1999**, 19(7): 1097-1112.
119. Bokkenheuser VD, Shackleton CHL, and Winter J: *Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans*. Biochemical Journal. **1987**, 248(3): 953-6.
120. Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, et al.: *Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. **2000**, 10(3): 111-120.
121. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, et al.: *Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil*. Drug Metabolism and Disposition. **2001**, 29(11): 1492-1498.
122. Caruso D, Visioli F, Patelli R, Galli C, et al.: *Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans*. Metabolism, Clinical and Experimental. **2001**, 50(12): 1426-1428.
123. Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJC, and Johnson IT: *Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway*. Free Radical Biology and Medicine. **1998**, 25(1): 19-25.
124. Hong Y-J and Mitchell AE: *Identification of Glutathione-Related Quercetin Metabolites in Humans*. Chemical Research in Toxicology. **2006**, 19(11): 1525-1532.
125. Scalbert A and Williamson G: *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Journal of Nutrition. **2000**, 130(8S): 2073S-2085S.
126. Williamson G: *Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids*. Phytochemicals: Mechanisms of Action, [International Phytochemical Conference, "Phytochemicals: Mechanisms of Action"], 4th, Pomona, CA, United States, Oct. 21-22, 2002. **2004**: 21-33.

127. Lamuela-Raventos RM, Romero-Perez AI, Andres-Lacueva C, and Tornero A: **Review: Health effects of cocoa flavonoids**. Food Science and Technology International (London, United Kingdom). **2005**, 11(3): 159-176.
128. Piskula MK, Yamakoshi J, and Iwai Y: **Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach**. FEBS Letters. **1999**, 447(2,3): 287-291.
129. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, and Mattivi F: **Fast access of some grape pigments to the brain**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(18): 7029-7034.
130. Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, et al.: **Quercetin, but not Its Glycosides, Is Absorbed from the Rat Stomach**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2002**, 50(3): 618-621.
131. Vaidyanathan JB and Walle T: **Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2**. Pharmaceutical Research. **2001**, 18(10): 1420-1425.
132. Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, et al.: **Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer**. Experimental physiology. **1996**, 81(6): 943-55.
133. Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, et al.: **Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter**. Biochemical Pharmacology. **2003**, 65(7): 1199-1206.
134. Gee JM, Dupont MS, Rhodes MJC, and Johnson IT: **Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway**. Free Radical Biology & Medicine. **1998**, 25(1): 19-25.
135. Henry C, Vitrac X, Decendit A, Ennamany R, et al.: **Cellular Uptake and Efflux of trans-Piceid and Its Aglycone trans-Resveratrol on the Apical Membrane of Human Intestinal Caco-2 Cells**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(3): 798-803.
136. Arts ICW, Sesink ALA, and Hollman PCH: **Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. Comments**. Journal of Nutrition. **2002**, 132(9): 2823.
137. Henry-Vitrac C, Desmouliere A, Girard D, Merillon J-M, et al.: **Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells**. European Journal of Nutrition. **2006**, 45(7): 376-382.
138. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, et al.: **Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta -glucosidase activity**. FEBS Letters. **1998**, 436(1): 71-75.
139. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, et al.: **Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase**. FEBS Lett. FEBS Letters. **2000**, 468(2,3): 166-170.
140. Karakaya S: **Bioavailability of Phenolic Compounds**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **2004**, 44(6): 453-464.
141. Tilgmann C and Ulmanen I: **Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases**. Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications. **1996**, 684(1 + 2): 147-161.

142. Piskula MK and Terao J: *Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues*. The Journal of nutrition. **1998**, 128(7): 1172-8.
143. Donovan JL, Manach C, Rios L, Morand C, et al.: *Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3*. British Journal of Nutrition. **2002**, 87(4): 299-306.
144. Meng X, Lee M-J, Li C, Sheng S, et al.: *Formation and identification of 4'-O-methyl(-)-epigallocatechin in humans*. Drug Metabolism and Disposition. **2001**, 29(6): 789-793.
145. Lee M-J, Maliakal P, Chen L, Meng X, et al.: *Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. **2002**, 11(10, Pt. 1): 1025-1032.
146. Wu X, Cao G, and Prior RL: *Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry*. Journal of Nutrition. **2002**, 132(7): 1865-1871.
147. Falany CN: *Enzymology of human cytosolic sulfotransferases*. FASEB Journal. **1997**, 11(4): 206-216.
148. Vissers MN, Zock PL, and Katan MB: *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review*. European Journal of Clinical Nutrition. **2004**, 58(6): 955-965.
149. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, et al.: *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. Free Radical Biology & Medicine. **2002**, 33(2): 220-235.
150. Burchell B, Brierley CH, and Rance D: *Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation*. Life Sciences. **1995**, 57(20): 1819-31.
151. Walle T, Eaton EA, and Walle UK: *Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenolsulfotransferase*. Biochemical Pharmacology. **1995**, 50(5): 731-4.
152. Burchell B and Coughtrie MWH: *Genetic and environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation*. Environmental Health Perspectives Supplements. **1997**, 105(4): 739-747.
153. Sfakianos J, Coward L, Kirk M, and Barnes S: *Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats*. The Journal of nutrition. **1997**, 127(7): 1260-8.
154. Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, et al.: *The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids*. FEBS Letters. **1999**, 458(2): 224-230.
155. Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, et al.: *Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats*. Journal of Nutrition. **2001**, 131(8): 2109-2114.
156. Fisher MB, Paine MF, Strelevitz TJ, and Wrighton SA: *The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism*. Drug Metabolism Reviews. **2001**, 33(3 & 4): 273-297.
157. Doerge DR, Chang HC, Churchwell MI, and Holder CL: *Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry*. Drug Metabolism and Disposition. **2000**, 28(3): 298-307.

158. Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, et al.: *Regioselectivity of Phase II Metabolism of Luteolin and Quercetin by UDP-Glucuronosyl Transferases*. Chemical Research in Toxicology. **2002**, 15(5): 662-670.
159. Miro-Casas E, Farre Albaladejo M, Covas M-I, Rodriguez JO, et al.: *Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry Quantitative Determination of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Human Urine after Olive Oil Intake*. Analytical Biochemistry. **2001**, 294(1): 63-72.
160. Koster H, Halsema I, Scholtens E, Knippers M, et al.: *Dose-dependent shifts in the sulfation and glucuronidation of phenolic compounds in the rat in vivo and in isolated hepatocytes. The role of saturation of phenolsulfotransferase*. Biochemical Pharmacology. **1981**, 30(18): 2569-75.
161. Piskula MK: *Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats*. Journal of Nutrition. **2000**, 130(7): 1766-1771.
162. Fiorani M, Accorsi A, and Cantoni O: *Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir*. Free Radical Research. **2003**, 37(12): 1331-1338.
163. Vinson JA, Jang J, Yang J, Dabbagh Y, et al.: *Vitamins and Especially Flavonoids in Common Beverages Are Powerful in Vitro Antioxidants Which Enrich Lower Density Lipoproteins and Increase Their Oxidative Resistance after ex Vivo Spiking in Human Plasma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1999**, 47(7): 2502-2504.
164. Urpi-Sarda M, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Jaeger W, et al.: *Uptake of Diet Resveratrol into the Human Low-Density Lipoprotein. Identification and Quantification of Resveratrol Metabolites by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry. **2005**, 77(10): 3149-3155.
165. Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, et al.: *Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition*. European Journal of Clinical Nutrition. **2002**, 56(2): 114-120.
166. Vore M: *Regulation of drug conjugate processing by hepatocellular transport systems*. Handb. Handbook of Experimental Pharmacology. **1994**, 112(conjugation - deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity): 311-38.
167. Sallustio BC, Sabordo L, Evans AM, and Nation RL: *Hepatic disposition of electrophilic acyl glucuronide conjugates*. Current Drug Metabolism. **2000**, 1(2): 163-180.
168. Coldham NG and Sauer MJ: *Pharmacokinetics of [14C]Genistein in the Rat: Gender-Related Differences, Potential Mechanisms of Biological Action, and Implications for Human Health*. Toxicology and Applied Pharmacology. **2000**, 164(2): 206-215.
169. Crespy V, Morand C, Besson C, Cotelle N, et al.: *The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound*. American Journal of Physiology. **2003**, 284(6, Pt. 1): G980-G988.
170. Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, et al.: *Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed sprague-dawley rat*. Journal of Nutrition. **2000**, 130(8): 1963-1970.
171. Winter J and Bokkenheuser VD: *Bacterial metabolism of natural and synthetic sex hormones undergoing enterohepatic circulation*. Journal of Steroid Biochemistry. **1987**, 27(4-6): 1145-50.

172. Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, et al.: **Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids**. Nutrition Research (New York). **1996**, 16(3): 517-44.
173. Manach C, Morand C, Texier O, Favier M-L, et al.: **Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin**. Journal of Nutrition. **1995**, 125(7): 1911-22.
174. Hollman PCH, van Trijp JMP, Mengelers MJB, de Vries JHM, et al.: **Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man**. Cancer Letters (Shannon, Ireland). **1997**, 114(1,2): 139-140.
175. Gonthier M-P, Cheynier V, Donovan JL, Manach C, et al.: **Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols**. Journal of Nutrition. **2003**, 133(2): 461-467.
176. RR. S: **CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds**, FC Press, Editor. **1991**.: Boca Raton.
177. Deprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, et al.: **Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids**. Journal of Nutrition. **2000**, 130(11): 2733-2738.
178. Graefe EU and Veit M: **Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from Equisetum arvense**. Phytomedicine. **1999**, 6(4): 239-246.
179. Clifford MN, Copeland EL, Bloxside JP, and Mitchell LA: **Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption**. Xenobiotica. **2000**, 30(3): 317-326.
180. Ernst T, Hergenbahn M, Kenzelmann M, Cohen CD, et al.: **Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: A gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue**. American Journal of Pathology. **2002**, 160(6): 2169-2180.
181. Esterbauer H, Puhl H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, et al.: **Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL**. Annals of Medicine (Stockholm, Sweden). **1991**, 23(5): 573-81.
182. Visioli F, Bogani P, Grande S, and Galli C: **Mediterranean food and health: building human evidence**. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society. **2005**, 56 Suppl 1: 37-49.
183. Boronat M, Chirino R, Varillas VF, Saavedra P, et al.: **Prevalence of the metabolic syndrome in the island of Gran Canaria: comparison of three major diagnostic proposals**. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. **2005**, 22(12): 1751-6.
184. Daniel Ramón Gutiérrez Rodríguez CRP, Ronel Carrazana Orozco: **Atherosclerosis y sus favorecedores**. Medicina preventiva y salud publica. **2007**.
185. Ross R: **Atherosclerosis is an inflammatory disease**. American heart journal. **1999**, 138(5 Pt 2): S419-20.
186. Badimon L, Badimon JJ, Vilahur G, Segales E, et al.: **Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications**. :Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis. **2002**, 32(5-6): 225-231.

187. Vitale JJ, White PL, Nakamura M, Hegsted DM, et al.: *Interrelations between experimental hypercholesteremia, magnesium requirement, and experimental atherosclerosis*. Journal of Experimental Medicine. **1957**, 106: 757-66.
188. JL. W: *The oxidation hypothesis of atherosclerosis*. Lancet. **1994** 344: 793-795. .
189. Jagla A and Schrezenmeir J: *Postprandial triglycerides and endothelial function*. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association. **2001**, 109(4): S533-47.
190. McNeely MJ, Edwards KL, Marcovina SM, Brunzell JD, et al.: *Lipoprotein and apolipoprotein abnormalities in familial combined hyperlipidemia: a 20-year prospective study*. Atherosclerosis (Shannon, Ireland). **2001**, 159(2): 471-481.
191. Murdoch SJ, Boright AP, Paterson AD, Zinman B, et al.: *LDL composition in E2/2 subjects and LDL distribution by Apo E genotype in type 1 diabetes*. Atherosclerosis (Amsterdam, Netherlands). **2007**, 192(1): 138-147.
192. Princen HMG, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, van der Laarse A, et al.: *Supplementation with low doses of vitamin E protects LDL from lipid peroxidation in men and women*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. **1995**, 15(3): 325-33.
193. Lechleitner M, Auer B, Zilian U, Hoppichler F, et al.: *The immunosuppressive substance 2'-chloro-2'-deoxyadenosine modulates lipoprotein metabolism in a murine macrophage cell line (P388 cells)*. Lipids. **1994**, 29(9): 627-33.
194. Van De Vijver LPL, Van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, Van Der Laarse A, et al.: *Seasonal variation in low density lipoprotein oxidation and antioxidant status*. Free Radical Research. **1997**, 27(1): 89-96.
195. van de Vijver LP, Kardinaal AF, van Duyvenvoorde W, Kruijssen DA, et al.: *LDL oxidation and extent of coronary atherosclerosis*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. **1998**, 18(2): 193-9.
196. Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, de la Torre-Boronat MC, et al.: *Rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of retinol, alpha -tocopherol and beta -carotene in human plasma and low-density lipoproteins*. Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications. **2001**, 758(2): 315-322.
197. Carmena R, Ascaso JF, Camejo G, Varela G, et al.: *Effect of olive and sunflower oils on low density lipoprotein level, composition, size, oxidation and interaction with arterial proteoglycans*. Atherosclerosis (Shannon, Ireland). **1996**, 125(2): 243-255.
198. Wright AJA, Southon S, Chopra M, Meyer-Wenger A, et al.: *Comparison of LDL fatty acid and carotenoid concentrations and oxidative resistance of LDL in volunteers from countries with different rates of cardiovascular disease*. British Journal of Nutrition. **2002**, 87(1): 21-29.
199. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, et al.: *Beyond Cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. New England Journal of Medicine. **1989**, 320(14): 915-24.
200. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, et al.: *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine*. Lancet. **1993**, 341(8843): 454-7.
201. Chung BH, Franklin F, Cho BHS, Segrest JP, et al.: *Potencies of lipoproteins in fasting and postprandial plasma to accept additional cholesterol molecules released from cell*

- membranes*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. **1998**, 18(8): 1217-1230.
202. Xu X-P, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, et al.: *Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages*. Circulation. **1999**, 99(8): 993-998.
203. Kopprasch S, Richter K, Leonhardt W, Pietzsch J, et al.: *Urate attenuates oxidation of native low-density lipoprotein by hypochlorite and the subsequent lipoprotein-induced respiratory burst activities of polymorphonuclear leukocytes*. Molecular and Cellular Biochemistry. **2000**, 206(1&2): 51-56.
204. Wang X, Greilberger J, Ratschek M, and Jurgens G: *Oxidative modifications of LDL increase its binding to extracellular matrix from human aortic intima: influence of lesion development, lipoprotein lipase and calcium*. The Journal of pathology. **2001**, 195(2): 244-50.
205. Sigurdardottir V, Fagerberg B, and Hulthe J: *Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study)*. Journal of Internal Medicine. **2002**, 252(5): 440-447.
206. Kalkan Yildirim H, Delen Akcay Y, Guevenc U, and Yildirim Soezmen E: *Protection capacity against low-density lipoprotein oxidation and antioxidant potential of some organic and non-organic wines*. International Journal of Food Sciences and Nutrition. **2004**, 55(5): 351-362.
207. Halliwell B: *Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis*. British journal of experimental pathology. **1989**, 70(6): 737-57.
208. Kaur C and Kapoor HC: *Antioxidant activity and quality of minimally processed Indian cabbage (Brassica oleracea var capitata)*. Journal of Food Processing and Preservation. **2001**, 25(5): 367-380.
209. Ballester M: *Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach*. Medicina clinica. **1996**, 107(13): 509-15.
210. Heinecke JW: *Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis*. Atherosclerosis (Shannon, Ireland). **1998**, 141(1): 1-15.
211. Young IS and Woodside JV: *Antioxidants in health and disease*. Journal of clinical pathology. **2001**, 54(3): 176-86.
212. Ohara Y, Peterson TE, and Harrison DG: *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. Journal of Clinical Investigation. **1993**, 91(6): 2546-51.
213. Gutteridge JMC: *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clinical Chemistry (Washington, D. C.). **1995**, 41(12B, Pt. 2): 1819-28.
214. Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G, Johnson A, et al.: *Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans*. Circulation. **1997**, 96(10): 3287-93.
215. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, and Juergens G: *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radical Biology & Medicine. **1992**, 13(4): 341-90.

216. Sanchez-Quesada JL, Ortega H, Payes-Romero A, Serrat-Serrat J, et al.: *LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects*. *Atherosclerosis*. **1997**, 132(2): 207-13.
217. Chang YH, Abdalla DSP, and Sevanian A: *Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein*. *Free Radical Biology & Medicine*. **1997**, 23(2): 202-214.
218. Yang C-Y, Gu Z-W, Xie Y-H, Valentinova NV, et al.: *Effects of gemfibrozil on very-low-density lipoprotein composition and low-density lipoprotein size in patients with hypertriglyceridemia or combined hyperlipidemia*. *Atherosclerosis (Shannon, Ireland)*. **1996**, 126(1): 105-116.
219. Tanaka K, Iguchi H, Taketani S, Nakata R, et al.: *Facile degradation of apolipoprotein B by radical reactions and the presence of cleaved proteins in serum*. *Journal of Biochemistry*. **1999**, 125(1): 173-176.
220. Hazell LJ and Stocker R: *Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages*. *The Biochemical journal*. **1993**, 290 ( Pt 1): 165-72.
221. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, and Galli C: *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents*. *Atherosclerosis (Shannon, Ireland)*. **1995**, 117(1): 25-32.
222. Visioli F and Galli C: *Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation*. *Life Sciences*. **1994**, 55(24): 1965-71.
223. Visioli F: *Antioxidants in Mediterranean diets*. *World Review of Nutrition and Dietetics*. **2000**, 87(Mediterranean Diets): 43-55.
224. Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, et al.: *Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans*. *Biochemical and biophysical research communications*. **2000**, 278(3): 797-9.
225. Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, et al.: *Antioxidant and Other Biological Activities of Olive Mill Wastewaters*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47(8): 3397-3401.
226. Covas M-I, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, et al.: *The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial*. *Annals of Internal Medicine*. **2006**, 145(5): 333-341.
227. Ruano J, Lopez-Miranda J, de la Torre R, Delgado-Lista J, et al.: *Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients*. *American Journal of Clinical Nutrition*. **2007**, 86(2): 341-346.
228. Petroni A, Balsevich M, Salami M, Papini N, et al.: *Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil*. *Thrombosis Research*. **1995**, 78(2): 151-60.
229. De La Puerta R, Gutierrez VR, and Hoult JRS: *Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil*. *Biochemical Pharmacology*. **1999**, 57(4): 445-449.
230. Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S-i, and Sekiya K: *Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **1997**, 61(2): 347-350.



231. Visioli F, Bellosta S, and Galli C: ***Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages.*** Life Sciences. **1998**, 62(6): 541-546.
232. Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, et al.: ***Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis.*** Journal of Clinical Investigation. **1996**, 97(8): 1837-43.
233. Jessup JM, Battle P, Waller H, Edmiston KH, et al.: ***Reactive nitrogen and oxygen radicals formed during hepatic ischemia-reperfusion kill weakly metastatic colorectal cancer cells.*** Cancer research. **1999**, 59(8): 1825-9.
234. Bloodsworth A, O'Donnell VB, and Freeman BA: ***Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation.*** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. **2000**, 20(7): 1707-1715.
235. Milner JA: ***Functional foods: the US perspective.*** American Journal of Clinical Nutrition. **2000**, 71(6, Suppl.): 1654S-1659S.
236. Morello J-R, Vuorela S, Romero M-P, Motilva M-J, et al.: ***Antioxidant Activity of Olive Pulp and Olive Oil Phenolic Compounds of the Arbequina Cultivar.*** Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(6): 2002-2008.
237. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, et al.: ***Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress.*** Circulation. **2000**, 102(18): 2169-2171.
238. de la Torre R: ***Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans.*** Inflammopharmacology. **2008**, 16(5): 245-247.
239. Visioli F, Galli C, Galli G, and Caruso D: ***Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols.*** European Journal of Lipid Science and Technology. **2002**, 104(9-10): 677-684.





## **5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



Optimizar la alimentación es uno de los retos actuales para prevenir las enfermedades crónicas [235], en especial las enfermedades cardiovasculares por ser la causa de mortalidad y morbilidad mas importante del mundo occidental.

Los efectos cardioprotectores del aceite de oliva son bien conocidos. Un hecho destacable que viene a confirmar los beneficios del aceite de oliva ha sido la reciente calificación (*Health claim*) de este alimento por parte de la la Food and Drugs Administration de EEUU (FDA) publicada el 1 de Noviembre del 2004 en la que se considera:

*“Una evidencia limitada y no concluyente sugiere que la ingesta de 23g/día de Aceite de Oliva puede reducir el riesgo de enfermedades crónicas atribuidas a la grasa monoinsaturada del aceite de oliva. Para conseguir esto el aceite de oliva ha de remplazar una cantidad similar de grasa saturada y no incrementar el total de calorías de la ingesta diaria”.*

Pero los científicos han seguido trabajando en la relación entre aceite de oliva y salud y quieren ir más allá, ya que creen, que las alegaciones a la calidad nutricional del aceite de oliva no tienen porque estar únicamente basadas en su perfil monoinsaturado, también se hipotetiza con que las fracciones minoritarias del aceite tienen un alto valor nutricional. Por tanto, si consiguiésemos profundizar en las propiedades de los compuestos minoritarios, en particular en los de tipo fenólico, y demostrar nuevos efectos cardioprotectores, se podría afirmar que el incremento en el consumo de aceite de oliva contribuiría a la optimización de la dieta de sus consumidores. Para cumplir con esta alegación de salud, es necesario completar una serie de estudios que proporcionen mayor información sobre la actividad biológica de los componentes minoritarios.

Por el momento, es indudable el interés del estudio de la fracción fenólica como antioxidante. El recuento de trabajos científicos publicados, recogidos en la base de datos Scopus, durante los últimos veinte años muestra una tendencia creciente en la que se ha pasado de unos 50 artículos por año al inicio de los años 90 a más de 900 artículos en el año 2008. En ellos se abordan temas tales como la caracterización de la fracción fenólica, los mecanismos de protección frente a la oxidación, estudios in vitro e in vivo de capacidad antioxidante, estudios de biodisponibilidad y estudios de intervención con dietas.

Hasta ahora, los resultados preliminares tras la evaluación de la actividad antioxidante en sistemas modelos de los fenoles del fruto y del aceite de forma aislada, han demostrado que la actividad antioxidante corresponde a los compuestos con una estructura 3,4-dihidroxi unida a un anillo aromático en su molécula y su actividad depende de la polaridad del sustrato utilizado en el modelo. Los lignanos, debido a su actividad como quelante, actúan como antioxidantes tan solo en el “modelo liposoma”. Los flavonoides en su forma glucosídica no presentan actividad antioxidante en el modelo linoleato de metilo (apolar), a diferencia de la oleuropeína que en su forma glucosilada presenta gran actividad. Se puede decir que la mayor capacidad antioxidante de los fenoles del aceite de oliva virgen se debe a la presencia de la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), la forma

metilada de la oleuropeína aglicona y la luteolina (aunque este último compuesto se encuentra en baja concentración dentro de la fracción fenólica[236].

Pero, a pesar de que existe numerosa documentación sobre la actividad antioxidante de la fracción fenólica en sistemas modelo químico, mediante su capacidad para secuestrar radicales libres o captar metales, es menos la información publicada sobre la interacción de los componentes de la fracción fenólica con moléculas o sistemas biológicos como las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Tampoco hay información contrastada sobre aspectos de metabolismo, transporte intestinal y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Por todo ello y con la finalidad de aportar un mayor conocimiento en estos últimos temas se planteó la investigación que ha sido llevada a cabo y presentada en esta tesis doctoral.

Conjuntamente a esto, este trabajo se enmarca de forma premeditada, dentro de un proyecto orientado a la formulación de un aceite de oliva virgen enriquecido en compuestos fenólicos para optimizar la protección cardiovascular. Siempre teniendo en cuenta que una alegación de reducción de riesgo de enfermedad es muy compleja de alcanzar.

Se sabe que a nivel *in vivo*, existen evidencias crecientes de los beneficios del consumo de aceite de oliva sobre el desarrollo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas[25, 62, 148, 237-239]. Pero el tema sigue siendo controvertido, pues la magnitud de la mejora conseguida tras el tratamiento con aceites de oliva de alto contenido fenólico es sin embargo modesta para poder afirmar su valor como factor protector del riesgo cardiovascular.

Esto es explicable porque, a pesar de tener un perfil fenólico muy interesante incluso tras su procesado, la magnitud del aporte de compuestos fenólicos (3-15 mg/día) que se consigue a través de una dosis ajustada a la vida real, 25 a 50 mL de aceite de oliva en su forma natural, es baja. Sin olvidar que esta fracción está fuertemente afectada por distintos factores agronómicos y tecnológicos, que hacen muy irregular su presencia en el producto final.

Aun así, su eficacia antioxidante está bien demostrada y documentada y se sabe que su absorción se realiza de forma dosis-dependiente, estableciéndose la hipótesis de que es la matriz alimentaria del aceite de oliva (tanto los triglicéridos como los compuestos minoritarios) la que favorece la absorción y la biodisponibilidad de los fenoles.

Por ello, pese a que generalmente en la preparación de alimentos funcionales se tiende a añadir el compuesto activo fenólico, previamente aislado, sobre matrices neutras o sobre matrices alimentarias en las que se encuentra de forma natural, una buena alternativa a esta práctica podría ser la selección de materias primas que contuviesen ya el principio activo, pudiéndose enriquecer con extractos de sus propios compuestos bioactivos y aumentar de esta manera su funcionalidad "natural".

Así, se podrían conseguir efectos más marcados con un aceite funcional enriquecido con compuestos fenólicos, seleccionados en base a su actividad biológica y absorbibilidad y por tanto con mayor capacidad protectora frente a la oxidación y disfunciones endoteliales como

las antiinflamatorias y antitrombóticas. Frente al caso de los aceites de oliva naturales cuya composición fenólica esta condicionada por distintos factores agronómicos y tecnológicos.

Asimismo, el hecho de ser elaborado enriqueciendo el aceite con sus propios compuestos fenólicos podría favorecer la aceptación del producto final por parte del consumidor.

Para ello, se diseñará un aceite de oliva que contenga una mayor cantidad de compuestos fenólicos, potencialmente más beneficiosos y más absorbibles, y donde se demuestren nuevos efectos saludables mesurables, cumpliendo así con el criterio de aceite funcional. Paralelamente a ello, es imprescindible descartar la posible toxicidad de los compuestos fenólicos.

De este modo el aceite de oliva funcional optimizará la composición tradicional y a su vez, potenciará los aspectos beneficiosos de la dieta. Es imprescindible realizar estudios en el hombre que respalden los posibles efectos positivos sobre la reducción de los factores de riesgo cardiovascular.







## **6. OBJETIVOS**



El trabajo de tesis doctoral forma parte de un proyecto con financiación del Plan Nacional de I+D que lleva por título: **ACEITE DE OLIVA VIRGEN ENRIQUECIDO EN COMPUESTOS FENÓLICOS PARA OPTIMIZAR LA PROTECCIÓN CARDIOVASCULAR.**

El **OBJETIVO GLOBAL** de este proyecto es optimizar la composición del aceite de oliva virgen o de un producto de matriz grasa, a partir de la elección de componentes recientemente descritos de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen con demostrada actividad biológica y comprobar después su biodisponibilidad, junto con los efectos cardioprotectores de este aceite, sobre el hombre.

Este proyecto está estructurado en dos subproyectos:

**Subproyecto 1: Aceite de oliva virgen enriquecido en compuestos fenólicos. Obtención de fenoles purificados, evaluación de su potencial antioxidante y desarrollo de un prototipo de aceite de oliva enriquecido.**

**Subproyecto 2: Aceite de oliva virgen enriquecido en compuestos fenólicos para optimizar la protección cardiovascular. Del consumo a los efectos protectores cardiovasculares.**

En este proyecto participan:

- Unidad de Antioxidantes del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida.
- Unidad de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis de la Facultad de Medicina y Ciencia de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili.
- Unidad de Lípidos y Epidemiología Cardiovascular del I.M.I.M. (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas de Barcelona).
- La empresa La Morella Nuts S.A.

El **objetivo global** de la presente tesis doctoral está orientado a la evaluación de la capacidad antioxidante de los componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen y a la estimación de su metabolismo y potencial biodisponibilidad.

Para la consecución de este objetivo se han planteado los siguientes objetivos parciales:

**Objetivo 1.** Aislamiento y purificación de los componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen para la posterior evaluación de su capacidad antioxidante y su grado de biodisponibilidad.

**Objetivo 2.** Evaluación de la capacidad antioxidante de los componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen mediante diferentes modelos *in vitro*:

**Objetivo 2.1** Evaluación de la capacidad antioxidante mediante la evaluación de la inhibición de la formación de dienos conjugados utilizando como sustrato la LDL.

**Objetivo 2.2.** Evaluación de la capacidad antioxidante mediante la cuantificación de grupos carbonilos en sistema modelo de LDL. Evaluación de la protección de los cambios producidos en el lipidoma de la LDL mediante diferentes sistemas de inducción oxidativa.

**Objetivo 2.3** Evaluación de la capacidad de protección de la apoptosis celular.

**Objetivo 3.** Evaluar la digestibilidad, metabolismo y transporte de los componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva en modelo de digestión *in vitro* y en modelo celular Caco2/TC7, respectivamente.

**Objetivo 4.** Puesta a punto y validación de la metodología de identificación y cuantificación de los fenoles de aceite de oliva en plasma humano. Aplicación al estudio del perfil fenólico de consumidores habituales de aceite de oliva virgen.



## **7. PLAN DE TRABAJO**



El plan de trabajo que se ha seguido a la hora de llevar a cabo la labor de investigación ha sido el siguiente:

	AÑO 1				AÑO 2				AÑO 3				AÑO 4			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1. Revisión bibliográfica del tema y elaboración de una base de datos.																
Se ha realizado una búsqueda y recopilación de la literatura existente en relación con el aceite de oliva virgen. Principalmente se ha llevado a cabo una revisión sobre:																
- Composición química del aceite de oliva, con especial énfasis en la composición de la fracción fenólica.																
- Actividades biológicas de los fenoles del aceite de oliva.																
- Métodos de evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> .																
- Metabolismo y biodisponibilidad de fenoles de aceite de oliva.																
2. Selección de metodologías de evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .																
- Puesta a punto de los diferentes métodos.																
- Purificación de compuestos fenólicos de la fracción fenólica de aceite de oliva virgen.																
- Aplicación de los métodos puestos a punto para la evaluación de la capacidad antioxidante de los fenoles de forma individual y en modelos de evaluación de sinergias.																
3. Puesta a punto de los modelos de digestión <i>in vitro</i> y aplicación para la evaluación de la digestibilidad y estabilidad de los componentes de la fracción fenólica.																

	AÑO 1				AÑO 2				AÑO 3				AÑO 4			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
4. Aplicación del modelo celular Caco2/TC7 para el estudio del metabolismo y transporte de los principales componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen.																
5. Desarrollo y validación del método de análisis de fenoles en plasma. Aplicación al estudio del perfil fenólico de plasma de consumidores habituales de aceite de oliva virgen.																
6. Análisis de los datos experimentales y discusión de los resultados.																
Se han analizado los datos obtenidos mediante distintas técnicas estadísticas que permiten establecer diferencias entre los diferentes compuestos fenólicos, con especial énfasis en la relación actividad-estructura de la molécula.																
Se ha realizado un análisis de los resultados para establecer las conclusiones de la investigación.																
7. Redacción de las publicaciones científicas, comunicaciones a congresos y la memoria de la tesis.																





## **8. CAPÍTULO II: RESULTADOS.** **Determinación de la capacidad antioxidante** **de los compuestos fenólicos del aceite de** **oliva**

### **8.1. ACCIÓN ANTIOXIDANTE SOBRE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LAS** **LIPOPROTEINAS HUMANAS DE BAJA DENSIDAD “LDL”**

### **8.2. ACCIÓN ANTIOXIDANTE SOBRE LA FRACCIÓN PROTEICA DE LAS** **LIPOPROTEINAS HUMANAS DE BAJA DENSIDAD**



## **ACCIÓN ANTIOXIDANTE SOBRE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LAS LIPOPROTEINAS HUMANAS DE BAJA DENSIDAD “LDL”**

### **ABSTRACT**

Phenolic compounds of virgin olive oil (VOO) with strong antioxidant LDL properties could protect against cardiovascular diseases. Prior studies focused on the phenolic compounds hydroxytyrosol and oleuropein while other phenolic fractions were not considered. Moreover, these phenolic compounds VOO can exert an antioxidant synergic effect. The antioxidant activities of 19 phenolic compounds of VOO were measured as the resistance (lag phase, in minutes) of LDL oxidation induced by  $\text{Cu}^{2+}$  *in vitro*. Flavonoids (luteolin and rutin) and secoiridoids (oleuropein, a dialdehydic form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol 3,4-DHPEA-EDA, and hydroxytyrosol) induced the highest resistance to oxidation, and a combination of these 5 phenolic compounds (0.2  $\mu\text{M}$  each) acted synergistically by increasing the LDL oxidation resistance 1.8-fold relative to the sum of each individual phenolic compound's antioxidant capacity ( $p < 0.05$ ). We identified, using a clean-up solid-phase extraction procedure with HPLC coupled to a TQD™ mass spectrometer, 4 of these 5 phenolic compounds in the plasma of volunteers consuming 40 ml of VOO. These were 3,4-DHPEA-EDA (identified for the first time in the literature), luteolin, hydroxytyrosol and oleuropein aglycone. Rutin was undetectable in these post-prandial plasmas.

We have described the *in vitro* antioxidant effects of phenolic compounds found in VOO and the identification of some of them in postprandial plasma following VOO intake. Our study supports the human antioxidant potential of these compounds *in vivo*.

## INTRODUCTION

Consensus scientific opinions support the beneficial effects of virgin olive oil (VOO) on coronary heart disease risk factors. These effects have been related not only to the high level of monounsaturated fatty acid content of VOO [1], but also to the presence of minor components such as phenolic compounds [2-4]. In experimental studies, these phenolic compounds have been shown to have strong antioxidant properties [5-8]. Oxidized low density lipoprotein (oxLDL) is currently thought to be more damaging to the arterial wall than native LDL [9-11]. Recently, results of randomized, crossover, controlled, clinical trials on the antioxidant effect of polyphenols derived from real-life daily doses of olive oil administered to healthy human volunteers, showed that plasma concentrations of oxLDL were reduced in a dose-dependant manner in relation to the increasing phenolic content of the ingested VOO [9]. The majority of these studies attributed the antioxidant properties of the VOO phenols to some specific components, mainly hydroxytyrosol and the precursor oleuropein [9, 12]. However, the phenolic fraction of VOO contains a broad spectrum of components, which concentrations depend on several agricultural and technological factors related to VOO production [13].

The secoiridoids, oleuropein and ligstroside are characteristic of *oleaceae* plants that include *Olea europaea* L. and are the major components of the phenolic fraction of olive fruits [14-16]. Oleuropein and ligstroside are esters of elenolic acid with hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) and tyrosol (*p*-HPEA), respectively, linked to a glucosidic residue (oleosidic skeleton common to the secoiridoid glycosides of *oleaceae*). During the crushing and malaxation steps of the VOO extraction process, the main transformations are related to the loss of the glucose residue, and the formation of aglycon forms of secoiridoids [14-16]. Besides of these major phenols, the VOO phenolic fraction contains flavonoids, lignans, phenolic acids, phenyl ethyl alcohols and hydroxy-isochromans in minor concentration.

Preliminar studies have shown the antioxidant activity of some of these individual and combined phenolic compounds using different test and lipid matrices that supported their contribution to the oxidative stability of virgin olive oil [7, 9, 19]. The highest activity was found with phenolic compounds that possess 3,4- dihydroxyl and 3,4,5-trihydroxy structures linked to an aromatic ring (oleuropein and some of their derivatives, such as 3,4- DHPEA-EDA, and some flavones, such as luteolin and apigenin) that conferred a higher proton dislocation to the moiety, thus facilitating the scavenging activity. Besides the antioxidant function in food systems, little attention has focused on the potential antioxidant activity of the minor components, or even of their potential synergistic effect in biological models.

Moreover, while polyphenols act as antioxidants in the test tube, it is not clear whether they are absorbed into the bloodstream and, if they are, how rapidly they are metabolized. Hence, more extensive knowledge of the identification in plasma and the bioavailability of the antioxidants, particularly phenolic compounds, in VOO would appear to be necessary.

Recently, new and more sensitive analytical methodologies have enabled the identification, structural characterization, and quantitative analysis of a large number of phenolic compounds of VOO [16-19].

Although several studies have demonstrated the *in vivo* antioxidant capacity of some phenolic compounds from olive oil [16], the low absolute amount of these individual phenolic compounds ingested in a real-life intake of VOO prompted us to hypothesize that, if detected in human plasma, these VOO phenolic compounds would lead to protection against LDL oxidation, with concomitant health benefits.

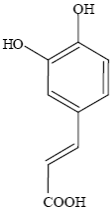
The aims of the present study were: firstly, to evaluate the antioxidant effect of a broad spectrum of phenolic compounds found in VOO; secondly, to explore if a synergy exists among them; and thirdly, to assess whether the phenolic compounds with the highest antioxidant combination were identifiable in plasma following an oral load of VOO.

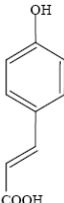
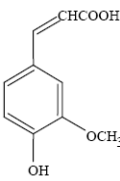
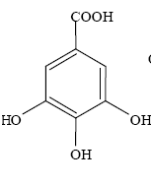
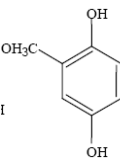
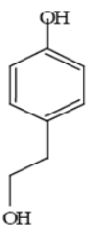
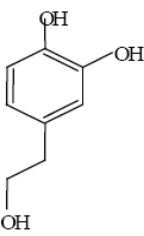
## MATERIAL AND METHODS

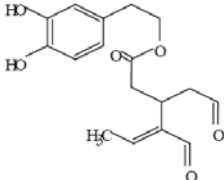
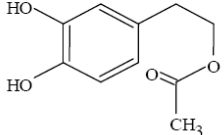
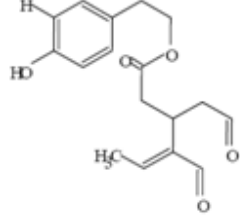
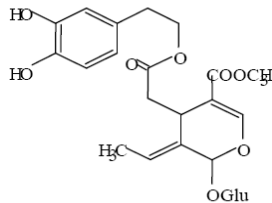
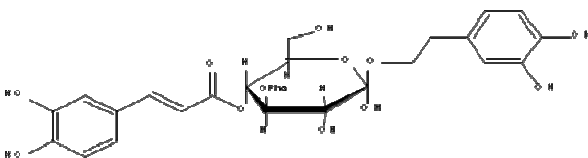
### Phenolic compounds

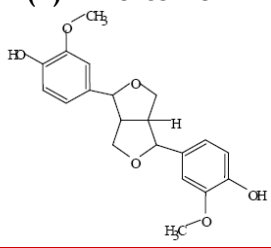
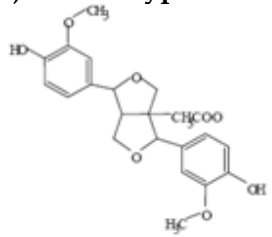
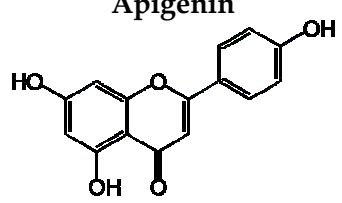
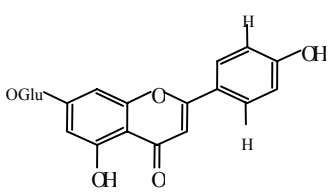
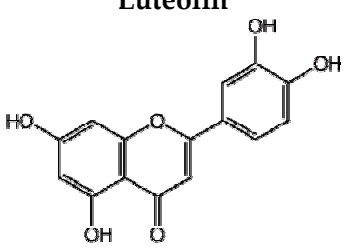
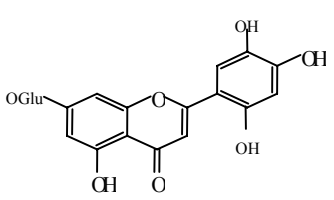
Some phenolic compounds included in the study have been isolated from VOO, and other are commercially available. The phenolic compounds purchased and used without further purification were: a) phenolic acids: *p*-coumaric acid and vanillin purchased from Extrasynthese (Genay, France); caffeic acid, ferulic acid, and gallic acid purchased from Fluka Co. (Buchs, Switzerland); b) phenyl ethyl alcohols: hydroxytyrosol, tyrosol; c) secoiridoids: oleuropein purchased from Extrasynthese (Genay, France); d) the hydrocinnamic derivative as verbascoside purchased from Extrasynthese (Genay, France); e) lignan (+)-pinoresinol purchased from Arbonova Sales (Turku, Finland); f) flavonoids: apigenin, apigenin 7-*O*-glucoside, luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside and rutin purchased from Extrasynthese (Genay, France); *α*-tocopherol used as antioxidant control in *in vitro* LDL oxidation experiments purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co.

Phenolic compounds isolated from VOO by semi-preparative HPLC [19] were: a) secoiridoid derivatives as 4-(acetoxylethyl)-1,2-dihydroxybenzene (3,4-DHPEA-AC), dialdehydic form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA), dialdehydic form of elenolic acid linked to tyrosol (*p*-HPEA-EDA); and b) lignan as (+)-1-acetoxypinoresinol. Stock solutions of commercial standards and phenolic compounds isolated from VOO were dissolved in methanol: water (80:20 v/v) and stored at -40 °C before being used in the evaluation of antioxidant activity. **Figure 8.1 1** shows the olive oil phenols included in the study.

Structures	Compounds
Phenolic acids	<p><b>Caffeic</b></p> 

	<p><b><i>p</i>-Coumaric</b></p> 
	<p><b>Ferulic</b></p> 
	<p><b>Gallic</b></p> 
<p>Phenyl acid derivative</p>	<p><b>Vanillin</b></p> 
<p>Phenyl ethyl alcohols</p>	<p><b>Tyrosol</b></p> 
	<p><b>Hydroxytyrosol</b></p> 

<p>Secoiridoids</p>	<p><b>3,4-DHPEA-EDA</b></p> 
	<p><b>3,4-DHPEA-AC</b></p> 
	<p><b><i>p</i>-HPEA-EDA</b></p> 
	<p><b>Oleuropein</b></p> 
<p>Hydrocinnamic derivatives</p>	<p><b>Verbascoside</b></p> 

Lignans	<p><b>(+)-Pinoresinol</b></p> 	
	<p><b>(+)-1-Acetoxypinoresinol</b></p> 	
Flavonoids	Flavones	<p><b>Apigenin</b></p> 
		<p><b>Apigenin-7-O-Glu</b></p> 
		<p><b>Luteolin</b></p> 
		<p><b>Luteolin-7-O-Glu</b></p> 



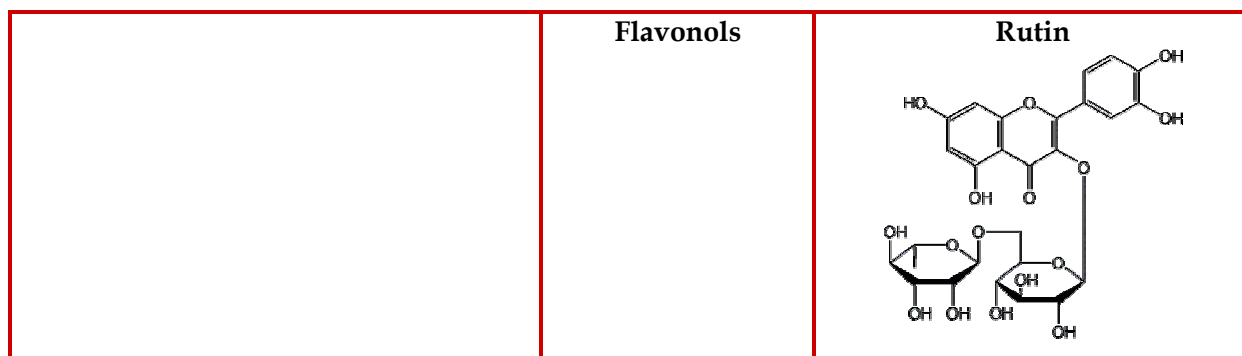


Figure 8.1 1. Structures of phenolic compounds used in the study

### *LDL isolation*

Plasma was collected from healthy human volunteers and LDL ( $d=1.019-1.063$ ) was isolated by sequential ultracentrifugation in a Kontron Centrikon T-1075 ultracentrifuge. Protein was measured by Bradford method [20] using BSA as a standard.

### *Formation of conjugated dienes*

Dialyzed LDL was adjusted to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  with PBS, pH 7.4. LDL oxidation was initiated by adding a freshly prepared  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  solution (final concentration 6  $\mu\text{M}$ ) and incubating at 30°C for 5h in 96 multi-well plates (Corning, Spain) in a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . The kinetic parameters of LDL oxidation were determined by monitoring the change in absorbance at 234 nm at 30°C with a Lambda 5 UV-spectrophotometer (Synergy HT, Biotek, Spain). This allowed for as many as 96 samples to be measured simultaneously. LDL not treated with test polyphenols was used as a control sample (control LDL). The blanks were prepared with the same volume of methanol as in the test samples. The phenolic compounds were dissolved in methanol at the desired concentration. To assess whether methanol interferes with the LDL oxidation, we prepared a control sample with LDL, PBS, methanol and cupric ions. No interferences in the conjugated dienes by the methanol were observed in these determinations. The lag phase was defined, using the method of Kleinveld et al [21], as the interval (in minutes) between the linear least-square slope of the curve intercept with the initial-absorbance axis.

To compare the antioxidant capacity of 19 individual phenolic compounds, the maximal concentration that produces the inhibition of lag phase was determined using the dose-response kinetic curves of each phenolic compound's inhibition of  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated LDL oxidation. The range of each individual compound used was 0 to 20  $\mu\text{M}$ , with  $\alpha$ -tocopherol at 0.5  $\mu\text{M}$  being used as control.

The effects of the 19 individual phenolic compounds on the lag phase of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation were tested at a concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  using, as reference, the LDL incubated without phenols and with  $\alpha$ -tocopherol as antioxidant control.

The antioxidant phenolic compounds observed to be the most active were selected and assayed individually at more physiologically-appropriate concentrations. Also, different combinations of the five compounds (each at 0.2  $\mu\text{M}$ ) were tested.

### ***Phenolic compounds analysis of VOO***

VOO was obtained directly from an olive oil mill in Catalunya (Spain) during the harvest season and was from the Arbequina variety of olives. LC tandem MS technology was used for the quantification of phenolic compounds (phenyl alcohols, phenyl acids, secoiridoid derivatives, lignans and flavonoids) in virgin olive oil [22].

### ***Participants and VOO load***

Two healthy individuals (aged 58 and 57 years) ingested a single 40 ml dose of VOO spread on 60 g of bread. The phenolic compound profile in post-prandial plasma taken from these individuals was determined at 0, 30, 60, 120 and 240 minutes following the VOO ingestion. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of *Hospital Universitari Sant Joan* (Reus). All participants provided written informed consent before being enrolled.

### ***SPE of phenols in post-prandial human plasma***

The phenolic extracts of human plasma were obtained with a solid phase extraction procedure using a slightly modified method of Ruiz-Gutierrez et al. [23]. Briefly, just prior to the extraction procedure, a solution (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of caffeic acid was added as an internal standard and 30  $\mu\text{L}$  of phosphoric acid (85% v/v) was added to 3 ml aliquots of defrosted plasma, and vortex mixed for 1 min. Solid phase purification of phenols from plasma samples was performed on an Oasis HLB extraction cartridge (200 mg, 6ml; WAT 106202) purchased from Waters (Milford, USA). Prior to use, the cartridge was primed with 3 ml of methanol followed by equilibration with 3 ml of water. A 3 ml aliquot of spiked acidified plasma was slowly loaded into the cartridge, followed by 1.5 ml of Milli-Q purified water, followed by 3 ml of 5% (v/v) methanol/water. The phenolic fraction was eluted under vacuum with 6 ml of methanol and collected in a tube containing 30  $\mu\text{L}$  of 1% ascorbic acid solution. The phenolic fraction was dried under a nitrogen stream. Before the HPLC analysis, the residue was re-dissolved with 200  $\mu\text{L}$  methanol and 100  $\mu\text{L}$  water/2% acetic acid.

### ***Quantification of VOO phenols in postprandial human plasma***

Phenolic extracts from postprandial human plasma were quantified by HPLC coupled to a TQD™ mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The HPLC system consisted of an AcQuity™ equipped with a binary pump (Waters, Milford, MA, USA). The column was an Inertsil ODS-3 column (5 $\mu\text{m}$ , 15cm $\times$ 4.6mm) (GL Sciences Inc.) equipped with a Spherisorb S5 ODS-2 precolumn (5 $\mu\text{m}$ , 1 cm $\times$ 4.6mm) (Technokroma, Barcelona). During the analysis, the column was kept at 30°C and the flow rate at 0.4 ml/min. The mobile phase was eluent A: Milli-Q water/acetic acid (100/0.2, v/v) and eluent B: acetonitrile. The HPLC was coupled to a

TQD™ mass spectrometer and the software used was MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA). Ionization was achieved using electrospray interface (ESI) operating in the negative mode  $[M-H]^-$  and the data were collected using selected reaction monitoring (SRM). The ionization source parameters were capillary voltage 3kV, source temperature 150°C and gas temperature 400°C, with a flow rate of 800 L/h. Nitrogen (99.99% purity, N<sub>2</sub>LCMS nitrogen generator, Claind, Lenno, Italy) and argon ( $\geq 99.99\%$  purity, Aphagaz, Madrid, Spain) were used as cone and collision gases, respectively. The SRM transitions and the individual cone voltage and collision energy for each phenolic compound were evaluated by introducing 10 mg/L of each pure compound in order to set the optimum instrumentation conditions. Phenols of the plasma samples were quantified by a four-point regression curve using standards obtained from commercial suppliers, or by semi-preparative HPLC [19]. The results are expressed as  $\mu\text{M}$  phenol concentration.

### Statistical analyses

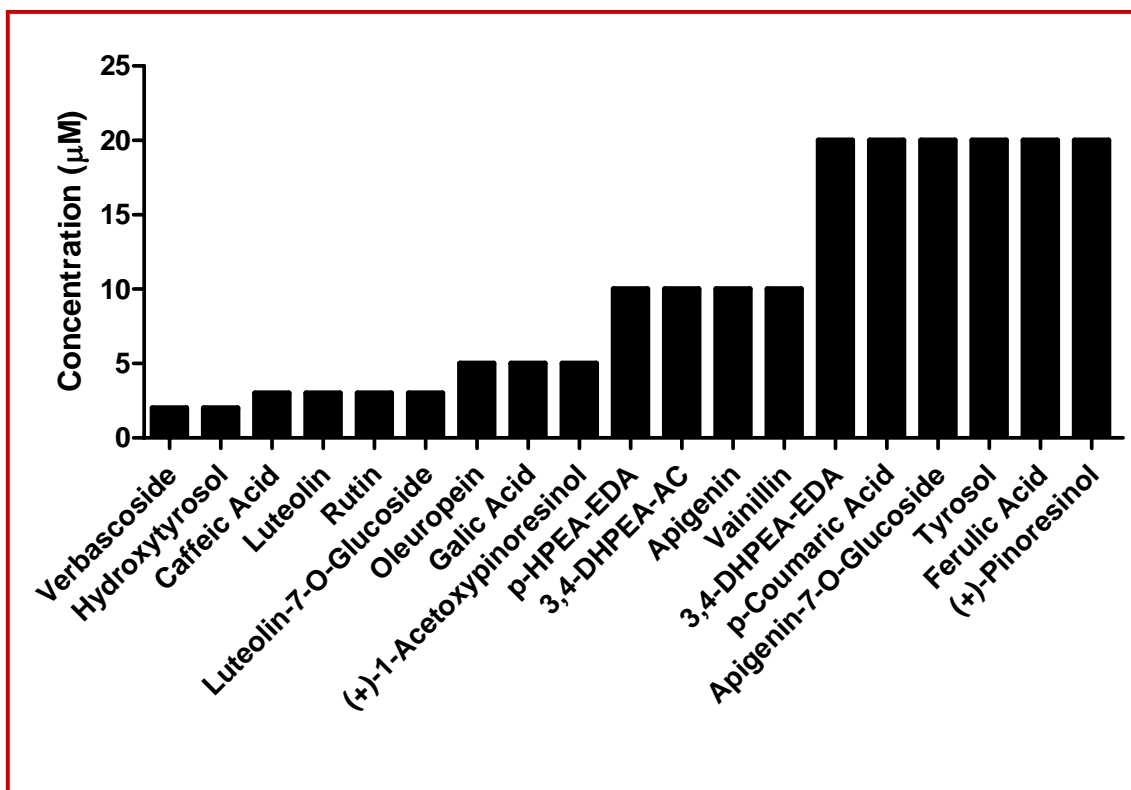
Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Results of the lag phase of polyphenolic compounds were expressed as the prolongation of the lag phase of LDL (min) by subtracting the lag phase of control LDL (min) (without phenolic compound addition). The dose-response of each compound was analyzed by Spearman's correlation test. One-way ANOVA was used to compare the means, followed by *post-hoc* Bonferroni test for multiple comparisons. The Student *t*-test was used to determine the significance of the interactions (synergy) between the polyphenolic compounds by comparing the observed (actual) values with the expected (calculated) sums of the individual polyphenolic compounds [24]. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Science software package (SPSS version 15.0). Unless otherwise specified, all experiments were performed at least in triplicate.

## RESULTS

### *Dose-response kinetic curves of individual VOO phenolic compounds on Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation*

The criteria of selection of 19 phenolic compounds was based on the interest to evaluate the potential activity of the different phenol groups that form the VOO phenol fraction even though some of them are low concentration: phenolic acids, phenyl ethyl alcohols, secoiridoids, lignans and flavonoids. The 19 phenolic were evaluated for know the concentrations that produce the inhibition of diene formation lag phase; a measure of the inhibitory (antioxidant) effect on Cu<sup>2+</sup>-mediated LDL oxidation. The dose-response kinetic curves of the phenolic compounds against Cu<sup>2+</sup>-mediated LDL oxidation were determined in the range of 0 to 20  $\mu\text{M}$ , with 0.5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -tocopherol as antioxidant control. Eighteen of the 19 compounds tested reduced the susceptibility of LDL to Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation in a dose-dependent and linear manner ( $p < 0.0001$ ). Ferulic acid showed a prooxidant effect at concentrations below 5  $\mu\text{M}$ . To compare the antioxidant capacity of different phenols, the minimum concentration that produces the inhibition of lag phase was determined. The data are presented in **Figure 2**. Hydroxytyrosol and

verbascoside showed, at 2  $\mu\text{M}$ , an inhibition of the LDL oxidation while 3,4-DHPEA-EDA, p-coumaric acid, apigenin, tyrosol, ferulic acid and (+)-pinoresinol needed concentrations of up to 20  $\mu\text{M}$  to inhibit LDL oxidation.



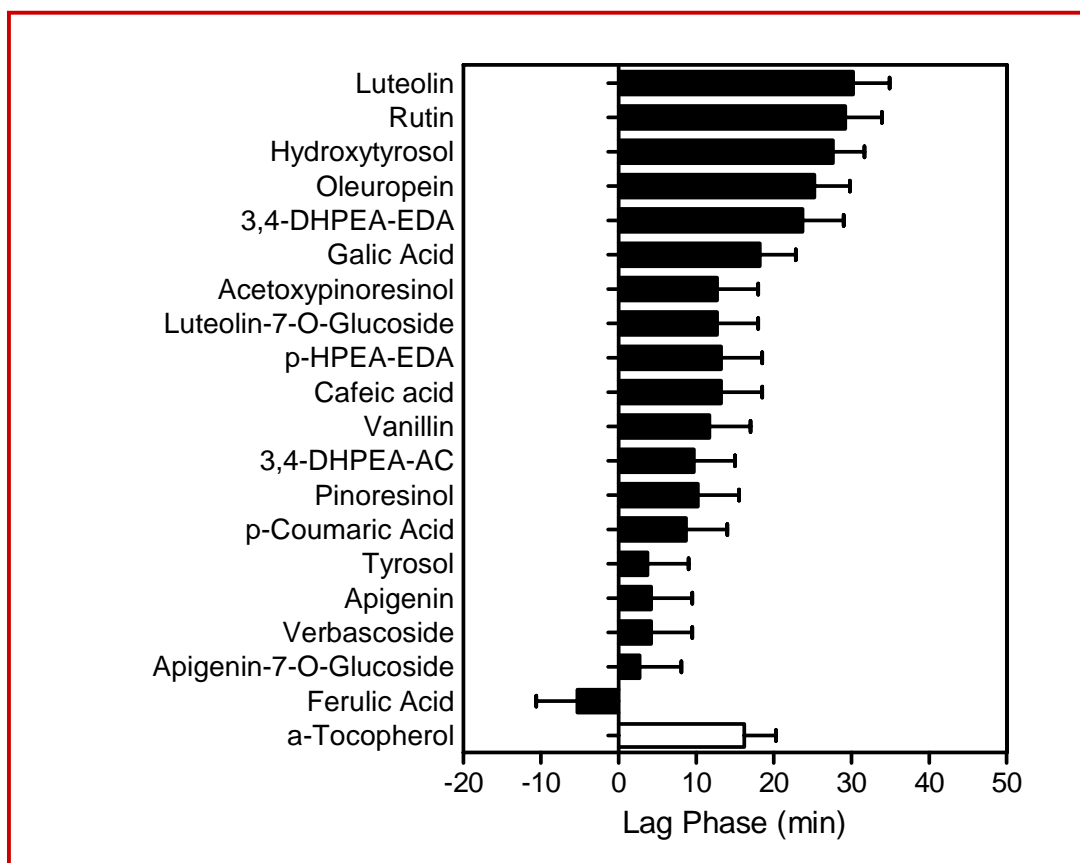
**Figure 8.1 2** Concentrations of the different olive oil phenols (luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropein, 3,4-DHPEA-EDA, galic acid, acetoxypinoresinol, luteolin-7-O-glucoside, p-HPEA-EDA, caffeic acid, vanillin, 3,4-DHPEA-AC, pinoresinol, p-coumaric acid, tyrosol, apigenin, verbascoside, apigenin-7-O-glucoside, ferulic acid) required for the inhibition of the LDL lag phase (in minutes). Each compound was tested in the range of 0 to 20  $\mu\text{M}$ ;  $\alpha$ -tocopherol at a concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  was used as control.

The dose-response kinetic curves of each phenolic compound showed that 0.5  $\mu\text{M}$  was the minimum concentration that produced a prolongation of the lag-phase of LDL, relative to control LDL (without phenolic compound addition). Thus, 0.5  $\mu\text{M}$  was the concentration of phenolic compounds used in subsequent experiments to compare the antioxidant capacity of each phenolic compound.

### *Effect of the individual VOO phenolic compounds on the lag phase of $\text{Cu}^{2+}$ -mediated LDL oxidation*

Each of the 19 phenolic compounds was tested at a concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  using, as reference, the LDL without added phenolic compounds and  $\alpha$ -tocopherol as antioxidant control. The

findings are presented in **Figure 3**. Results are expressed as the prolongation of the lag phase of LDL (in minutes) by subtracting the lag phase of control LDL (without phenolic compound addition). LDL incubated with  $\alpha$ -tocopherol showed an increase in the lag phase of  $16.2 \pm 4.07$  min compared to control LDL (without phenolic compound addition). Five phenolic compounds showed significant ( $p < 0.05$ ) prolongations in the lag phase relative to control LDL. The ranking values were luteolin ("L";  $30.2 \pm 4.69$  min,  $p < 0.0001$ ) > rutin ("R";  $29.2 \pm 4.69$  min,  $p < 0.0001$ ) > hydroxytyrosol ("H";  $27.6 \pm 4.06$  min,  $p < 0.0001$ ) > oleuropein ("O";  $25.2 \pm 4.69$  min,  $p < 0.001$ ) > 3,4-DHPEA-EDA ("D";  $23.7 \pm 5.38$  min,  $p < 0.05$ ). Apigenin-7-O-glucoside, verbascoside, apigenin and tyrosol showed no effect. The rest of the phenols tested also had lag phase prolongation times, but without reaching statistical significance. Ferulic acid showed a mild reduction in the lag phase relative to control LDL, suggesting a prooxidant effect ( $5.3 \pm 5.38$  min).



**Figure 8.1 3** Prolongation of the lag phase of LDL following incubation with olive oil phenols (0.5  $\mu$ M), luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropein, 3,4-DHPEA-EDA, galic acid, acetoxypinoresinol, luteolin-7-O-glucoside, p-HPEA-EDA, caffeic acid, vanillin, 3,4-DHPEA-AC, pinoresinol, p-coumaric acid, tyrosol, apigenin, verbascoside, apigenin-7-O-glucoside, ferulic acid, and  $\alpha$ -tocopherol. The values are relative to control LDL. Results are expressed as in minutes (mean  $\pm$  SEM) increased with respect to control LDL. \* Mean significant different from control LDL  $p < 0.05$  by Bonferroni test. Measurements were performed in triplicate.

### *Synergistic effect of phenolic compounds on the increase in the lag phase of Cu<sup>2+</sup> induced LDL oxidation*

Compounds showing the highest antioxidant effect in the experiment described above (section 3.2) were L > R > H > O > D and, in the present *in vitro* assay, the lowest concentration used was 0.2µM in order to mimic the phenolic concentration detection levels in human plasma (**Table 1**). **Table 1** shows an increase in the lag phase of the 5 compounds at 0.2µM, similar to that observed with the same compounds at 0.5µM.

**Table 8.1 1.** Prolongation of the lag-phase of LDL after incubation with 0.2 µM of phenolic compounds alone or in combination relative to control LDL (without phenolic compounds) and the expected effect.

Phenolic Compound	Lag Phase (minutes) Actual observation (mean±SEM)	Lag Phase (minutes) Expected effect (sum of individual effects) <sup>1</sup>
<i>Individual</i>		
L	41.00±15.23	
D	21.56±11.75	
R	21.44±5.06	
O	17.56±13.64	
H	13.87±11.83	
<i>Combination</i>		
HLORD <sup>a,b</sup>	207.46±19.48	115.43 (1.8)
HLOR <sup>a,b</sup>	183.94±22.05	93.87 (1.9)
LORD <sup>a,b</sup>	150.41±14.09	101.56 (1.5)
HLRD <sup>a,b</sup>	139.18±6.57	97.87 (1.4)
HORD <sup>a,b</sup>	133.22±16.85	74.43 (1.8)
HLOD <sup>a,b</sup>	123.20±14.09	93.99 (1.3)

<sup>a</sup>Mean (actual observation) significantly different from the control LDL (p<0.05 by ANOVA)

<sup>b</sup>Mean (actual observation) significantly different from the sum of the individual effects (p<0.05 by Student *t*-test). A value of p<0.05 indicates synergy.

<sup>1</sup> Numbers in parentheses indicate the ratio of observed to calculated value of individual effects. Numbers <1.0 indicate synergy.

Measurements were performed in quintuplicate.

L=luteolin; D=3,4-DHPEA-EDA; R= rutin; O=oleuropein; H=hydroxytyrosol

The combination of 4 and/or 5 phenolic compounds showed a significant increase (p<0.05) in the prolongation of the lag phase of LDL relative to control LDL (without phenolic compounds). Synergistic interactions were found when combinations of 4 and/or 5 polyphenolic compounds were tested. The mixture of 4 compounds showed an increase in the lag phase that was 1.3, 1.4,

1.5, 1.8 and 1.9-fold that of the sum of the individual component effects (HLOD, HLRD, LORD, HORD and HLOR, respectively,  $p < 0.05$ ). Also the mixture of 5 compounds increased 1.8-fold ( $p < 0.05$ ) the sum of the individual effects. These effects were higher than the sum of the individual effects (expected effect). Thus, the overall effect of the 4 and/or 5 phenolic compounds was synergistic.

### *Identification of VOO phenolic compounds in postprandial human plasma having verifiable antioxidant effects in vitro*

The phenolic composition of VOO consumed by the volunteers is shown in **Table 8.1 2**. Of the 5 phenolic compounds with the highest antioxidant activity observed in the *in vitro* assays, 4 were present in human plasma following the 40 ml VOO ingestion, as observed in **Figure 8.1 4**. Luteolin concentration increased to 0.013  $\mu\text{M}$  at 60 min, 3,4-DHPEA-EDA to 1.17  $\mu\text{M}$ , oleuropein aglycone to 0.067  $\mu\text{M}$  at 120 min, and hydroxytyrosol to 1.66  $\mu\text{M}$  at 240 min post-ingestion of the VOO. Rutin was not detected in the human plasma following VOO ingestion.

**Table 8.1 2.** Concentration of phenolic compounds in the virgin olive oil consumed by the volunteers

Compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )
<b>Phenolic acids</b>	
Cinnamic acid	0.29
Coumaric acid	1.14
Ferulic Acid	0.28
Vanillic acid	0.78
Vanillin	1.77
<b>Phenyl ethyl alcohols</b>	
Hydroxytyrosol	13.01
Tyrosol	20.85
<b>Secoiridoid aglycons</b>	
3,4-DHPEA-AC	0.26
3,4-DHPEA-EDA	76.11
3,4-DHPEA-EA	45.34
Methyl 3,4-DHPEA-EA	7.05
Oleuropein derivative	1.48
<i>p</i> -HPEA-EDA	21.76
<i>p</i> -HPEA-EA	28.39
Ligstroside derivative	2.50

<b>Flavonoids</b>		
	Apigenin	1.39
	Luteolin	6.96
<b>Lignans</b>		
	Pinoresinol	2.60
	Acetoxipinoresinol	29.71
<b>Total phenols</b>		261.75

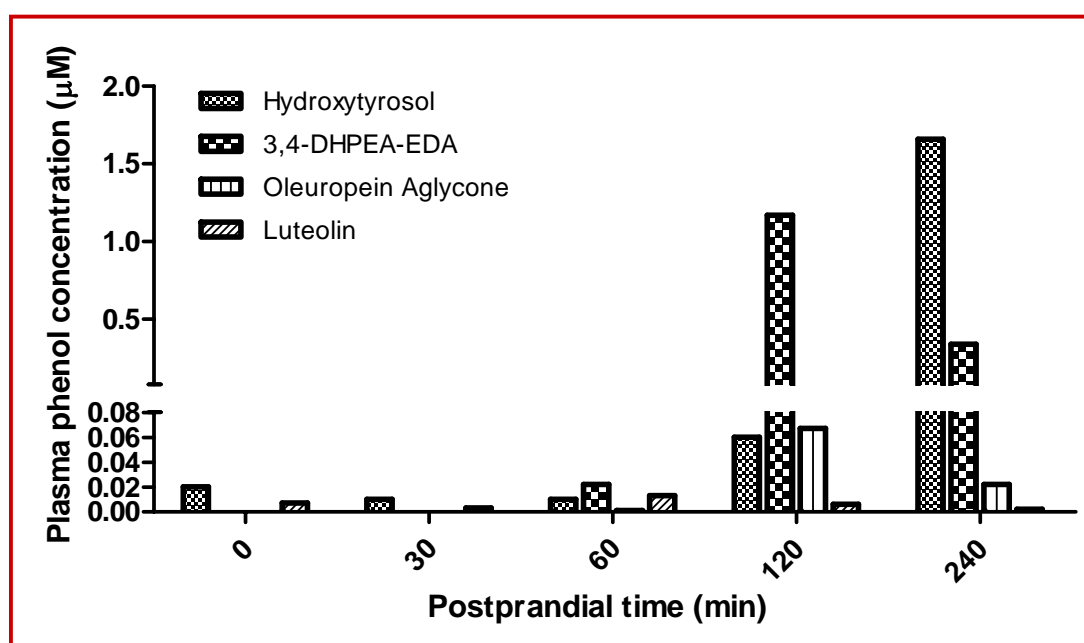


Figure 8.1 4 Phenol compounds concentrations ( $\mu\text{M}$ ) in post-prandial human plasma (240 min) following the oral intake of a single bolus of 40 ml of VOO.

## DISCUSSION

The *in vitro* antioxidant activity of 19 VOO phenolic compounds on LDL showed that half of them exert their activity at  $10 \mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) concentration; values at the low end of the range of concentrations (from  $<0.1 \mu\text{mol/L}$  to  $>100 \mu\text{mol/L}$ ) required to elicit effects *in vitro* [25, 26].

Luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropein, and 3,4-DHPEA-EDA were the most effective compounds in increasing the lag phase of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation. When these 5 phenolic compounds were mixed (at  $0.2 \mu\text{M}$  each), a synergistic effect was observed i.e. the lag phase was approximately 2-fold that of the sum of lag phases of the individual phenolic compounds. The



phenolic compounds studied were identified following 40 ml intake of VOO (the average daily intake of VOO in Mediterranean countries). The plasma concentration of these compounds was of the order of  $<2 \mu\text{M}$  and is similar to the concentration of other phenolic compounds detected in human plasma, and which rarely reach  $10 \mu\text{M}$  [25, 26]. 3,4 DHPEA-EDA had not been previously identified in post-prandial human plasma. Also detected were luteolin, hydroxytyrosol and oleuropein (as the aglycon form). Rutin had been described previously [28] in post-prandial plasma following VOO ingestion, but we were unable to confirm this finding. It could be because rutin is not a constituent of the VOO we had used, or was below the detection limit of our analytical procedures.

The antioxidant activities of the different phenolic compounds evaluated in the present study were related, in part, to their chemical structures [29]. For secoiridoids, an early study by Leenen et al [5] showed that the *ortho*-dihydroxy structure on the phenol rings (hydroxytyrosol and oleuropein in its glucosidic and aglycon forms) were more efficient than their *mono*-hydroxy counterparts (tyrosol and ligstroside in its glucosidal and aglycon forms) in increasing the resistance of LDL to oxidation. As such, the antioxidative capacity of luteolin was greater than that of luteolin-7-O-glucoside in which the glucose is linked to the *ortho*-dihydroxyl group at the C<sub>7</sub> position linked to an aromatic ring.

Oleuropein, in its glucosidic form, was not detected in human post-prandial plasma, probably because it was not a constituent, or was below the level of detection, of the VOO consumed in the present study. Also, in the case of VOO that contains low concentrations of oleuropein, the human digestive system causes the loss of the glucose molecule [16] and, as a consequence, the oleuropein available in human plasma following the ingestion of VOO corresponds to the aglycone chemical structure. Nevertheless, oleuropein aglycones retain the oleosidic skeleton common to the secoiridoid glucosides (hydroxytyrosol esters of elenolic acid) which is responsible for the antioxidant activity of oleuropein [16], and which could explain their role in increased resistance of LDL to oxidation *in vivo*. Our identification, in postprandial plasma, of the secoiridoid 3,4-DHPEA-EDA, is of special interest because it is the major component of phenolic compounds of VOO [22]. In the post-prandial plasma, 3,4-DHPEA-EDA concentration reached  $1.17 \mu\text{mol/L}$  at 120 min post-VOO ingestion.

Future studies need to focus on the *in vivo* biological effects of VOO phenolic compounds in humans. It is clear that food components need to be, by definition, in bioavailable forms in order to exert biological effects. In the past few years there have been major advances in our knowledge of phenolic compound absorption and metabolism [1-4], and it is apparent that most classes of polyphenols are sufficiently absorbed to have the potential to exert biological effects [25, 26]. For example, quercetin from onions, catechins from red wine, and isoflavones from soy reach micromolar concentrations in post-prandial plasma [25, 26]. These findings demonstrate that phenolic compounds cross the intestinal barrier and reach concentrations in the bloodstream that have been shown, in some studies, to exert effects *in vitro* [25, 26]. However, the precise effects depend on the class of phenolic compounds studied, and there are clear gaps in the current knowledge. For VOO, there is a need to demonstrate the dose, particularly with respect to secoiridoids, that is effective in reducing CVD risk in humans.

Further, in most studies (with the exception of studies on isoflavones), food items have been administered instead of pure compounds and, so, the effects noted could be attributable to some other component in that food item. Finally, the role of microflora needs to be understood in greater depth because gut microflora could play a major role in the metabolism of phenolic compounds determining their bioavailability and biological activity. This is an interesting approach since current debate focuses on whether individuals need to consume a food item or a pure phenolic compound as a dietary supplement [25, 26]. In our case of a Mediterranean diet, this option would be VOO.

A limitation of this study is that the antioxidant effect of phenolic compounds has been evaluated by only one type of assay i.e. the resistance of LDL to oxidation, as measured by conjugated dienes formation (which is an early stage of lipid peroxidation). Confirming our *in vitro* antioxidant findings, a recent study [30] demonstrated 3,4-DHPEA-EDA to have a protective role against oxidative injury in human cells *in vitro* caused by reactive oxygen species [30].

A further limitation of our study is that we approached only 2 volunteers to take part in the VOO intake study. Building on our findings, we are currently exploring VOO enriched with these phenolic compounds in order to demonstrate advantageous physiological effects.

## CONCLUSIONS

In summary, our results suggest that VOO phenolic compounds luteolin, rutin, 3,4-DHPEA-EDA, hydroxytyrosol, and oleuropein can act synergistically in increasing the resistance of LDL to oxidation. Our novel finding of the identification of 3,4-DHPEA-EDA in post-prandial plasma, together with confirmation of luteolin, hydroxytyrosol and oleuropein (in the aglycone form) support the *in vivo* antioxidant potential in humans of these compounds derived from virgin olive oil.

## REFERENCES

- [1] Aguilera CM, Mesa MD, Ramirez-Tortosa MC, Nestares MT, *et al.*: *Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease*. *Clinical Nutrition*. **2004**, 23: 673-681.
- [2] Visioli F, Bogani P, Grande S, Galli C: *Mediterranean food and health: building human evidence*. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **2005**, 56(Suppl. 1): 37-49.
- [3] Covas MI: *Olive oil and the cardiovascular system*. *Pharmacological Research*. **2007**, 55: 175-86.
- [4] Fito M, Guxens M, Corella D, Saez G, *et al.*: *Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial*. *Archives of Internal Medicine*. **2007**, 167: 1195-1203.
- [5] Leenen R, Roodenburg AJ, Vissers MN, Schuurbijs JA, *et al.*: *Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50: 1290-1297.
- [6] Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, *et al.*: *The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells*. *Journal of Nutrition*. **1997**, 127: 286-292.
- [7] Morelló JR, Vuorela S, Romero MP, Motilva MJ, Heinonen M: *Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53: 2002-2008.
- [8] Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, *et al.*: *Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53: 8918-8925.
- [9] Obied HK, Prenzler PD, Robards K: *Potent antioxidant biophenols from olive mill waste*. *Food Chemistry*. **2008**, 111: 171-178.
- [10] Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, *et al.*: *The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial*. *Annals of Internal Medicine*. **2006**, 145: 333-341.
- [11] Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, *et al.*: *Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells*. *Journal of Nutrition*. **1999**, 12: 1269-1277.
- [12] De-la-Torre KJ, Castellote A, Lamuela-Raventós R, Covas MI, *et al.*: *Rapid high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil metabolites in human low-density lipoproteins*. *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1116: 69-75.
- [13] Oliveras-López MJ, Innocenti M, Giaccherini C, Ieri F, *et al.*: *Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids*. *Talanta*. **2007**, 73: 726-732.
- [14] Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ, *et al.*: *Phenolic compounds in Spanish olive oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47: 3535-3540.
- [15] Ryan, D, Robards K, Prenzler P, Jardine D, *et al.*: *Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from Olea europaea*. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 855: 529-537.

- [16] Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gomez-Caravaca AM, *et al.*: *Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade.* *Molecules.* **2007**, 12: 1679-1719.
- [17] Brenes M, Hidalgo FJ, García A, Ríos JJ, *et al.*: *Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil.* *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **2000**, 77: 715-720.
- [18] Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, *et al.*: *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil.* *Clinical Chemistry.* **2000**, 46: 976-988.
- [19] Artajo LS, Romero MP, Morelló JR, Motilva MJ: *Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2006**, 54(16):6079-88.
- [20] Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* *Analytical Biochemistry.* **1976**, 72: 248-254.
- [21] Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN.: *Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein.* *Clinical Chemistry.* **1992**, 38: 2066-72.
- [22] Suarez M, Macià A, Romero MP, Motilva MJ: *Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil.* *Journal of Chromatography A.* **2008**, 1214: 90-99.
- [23] Ruiz-Gutierrez V, Juan ME, Cert A, Planas JM: *Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC.* *Analytical Chemistry.* **2000**, 72: 4458-4461.
- [24] Yeomans VC, Linseisen J, Wolfram G: *Interactive effects of polyphenols, tocopherols and ascorbic acid on the Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins.* *European Journal of Nutrition.* **2005**, 44: 422-428.
- [25] Williamson G, Manach C: *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies.* *American Journal of Clinical Nutrition.* **2005**, 81(suppl): 243S-255S.
- [26] Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, *et al.*: *Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials.* *American Journal of Clinical Nutrition.* **2008**, 88: 38-50.
- [27] Trichopoulou A., Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D: *Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population.* *New England Journal of Medicine.* **2003**, 348: 2599-608.
- [28] Lamuela-Raventós RM, Covas MI., Fitó M, Marrugat J, *et al.*: *Detection of dietary antioxidant phenolic compounds in human LDL.* *Clinical Chemistry.* **1999**, 45: 1870-1872.
- [29] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.* *Free Radical Biology and Medicine.* **1996**, 20: 933-956.
- [30] Paiva-Martins F, Fernandes J, Rocha S, Nascimento H. *et al.*. *Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage.* *Molecular Nutrition & Food Research.* **2009**, 53: 609-16.

## ACCIÓN ANTIOXIDANTE SOBRE LA FRACCIÓN PROTEICA DE LAS LIPOPROTEINAS HUMANAS DE BAJA DENSIDAD

### ABSTRACT

Olive-derived polyphenols exhibit antiatherogenic properties. This effect is partially mediated by their antioxidant properties over LDL. As LDL apoprotein oxidative modification is considered pathogenically relevant we used mass-spectrometry guided approaches for its further characterization after developing an screening method for protein antioxidant properties, based on the measurement of 2,4-dinitrophenyl hydrazine-reactive protein carbonyl in the Cu<sup>++</sup> induced human LDL oxidation. This was applied to 21 different olive-derived polyphenols. After selecting the most antioxidant ones, their effect on the accumulation of the structurally characterized carbonyl glutamic and amino adipic semialdehydes was demonstrated as well as for malondialdehyde-lysine in apoprotein, a lipoxidation markers. These analyses demonstrated maximal capacities for OH-tyrosol and pinoresinol. After TOF based lipidomics, 1-palmitoyllysophosphatidylcholine and 1-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine were identified as the most abundant differential lipids in Cu<sup>++</sup>-incubated LDL, associated to a general loss in fatty acid unsaturation. All the selected polyphenols, except luteolin, efficiently prevented accumulation of those phospholipids and changes in unsaturation. Finally, we demonstrated that OH-tyrosol, caffeic acid and luteolin inhibited cell death induced by Cu<sup>++</sup>-incubated LDL in the HMEC cell line, a strong correlation being shown between glutamic semialdehyde accumulation and cytotoxic potential. Globally, these data show novel antioxidant properties of olive-derived polyphenols in LDL oxidation.

## INTRODUCTION

The oxidative stress hypothesis of atherosclerosis is based on the fact that oxidation participates in atherogenesis pathophysiology by means of LDL modification, among other mechanisms [1-3]. Supporting this hypothesis, oxLDL have been detected in atherosclerotic lesions[4-6] and in vitro oxLDL seemed to exhibit various proatherogenic activities[3,7].

It is important to emphasize that oxLDL represents a heterogeneous population of modified forms of LDL that differ greatly in their chemical composition and functional properties. The conversion of native LDL into high-uptake LDL (completely oxidized) via oxidative processes can occur by two major mechanisms: In the first case, the events start with the complete loss of LDL's endogenous antioxidants (i.e.,  $\alpha$ -tocopherol, ubiquinol-10), followed by the conversion of a majority of the polyunsaturated fatty acids (PUFA) into their corresponding hydroperoxides. These primary lipid oxidation products then fragment into secondary lipid oxidation products, such as malonyldialdehyde or 4-hydroxynonenal. Then the secondary lipid oxidation products react with the N-amino group of lysine residues from LDL apoprotein (Apo B-100) so that the particle's electrophoretic mobility increases and the lipoprotein becomes "high uptake"[8]. Additionally, in the subendothelial space, oxLDL may exert a "Trojan horse effect", e.g. allowing the diffusion of those lipid mediators modifying endothelial and vascular smooth muscle cells. The second case is characterized by the immediate and preferential oxidation of amino acid residues from Apo B-100 in the absence of substantial consumption of lipid soluble antioxidants nor occurrence of lipid peroxidation [9].

With regard to the influence of diet on atherosclerosis, it is known that, besides  $\alpha$ -tocopherol, other compounds could protect against LDL oxidation. In this line, polyphenolic compounds from virgin olive oil, exhibiting a wide range of biological activity[10] reduce the susceptibility of the LDL to oxidation. This property has been attributed to some components, mainly tyrosol and OH-tyrosol and their precursor, oleuropein. However, the phenolic fraction of virgin olive oils is very complex and contains numerous groups of phenolic structures whose concentration depends on several agronomical and technological factors[11].

Despite a great deal of research having been devoted to the prevention of lipid peroxidation in LDL by antioxidants, including polyphenols[12][13-15], few studies have reported the prevention of protein oxidation in LDL by exogenous antioxidants. Apo B-100 modifications, e.g., the binding of lipid peroxidation products or direct oxidation of amino acid side-chain residues, are thought to finally result in the formation of new epitopes that are specifically recognized by scavenger receptors [16-19].

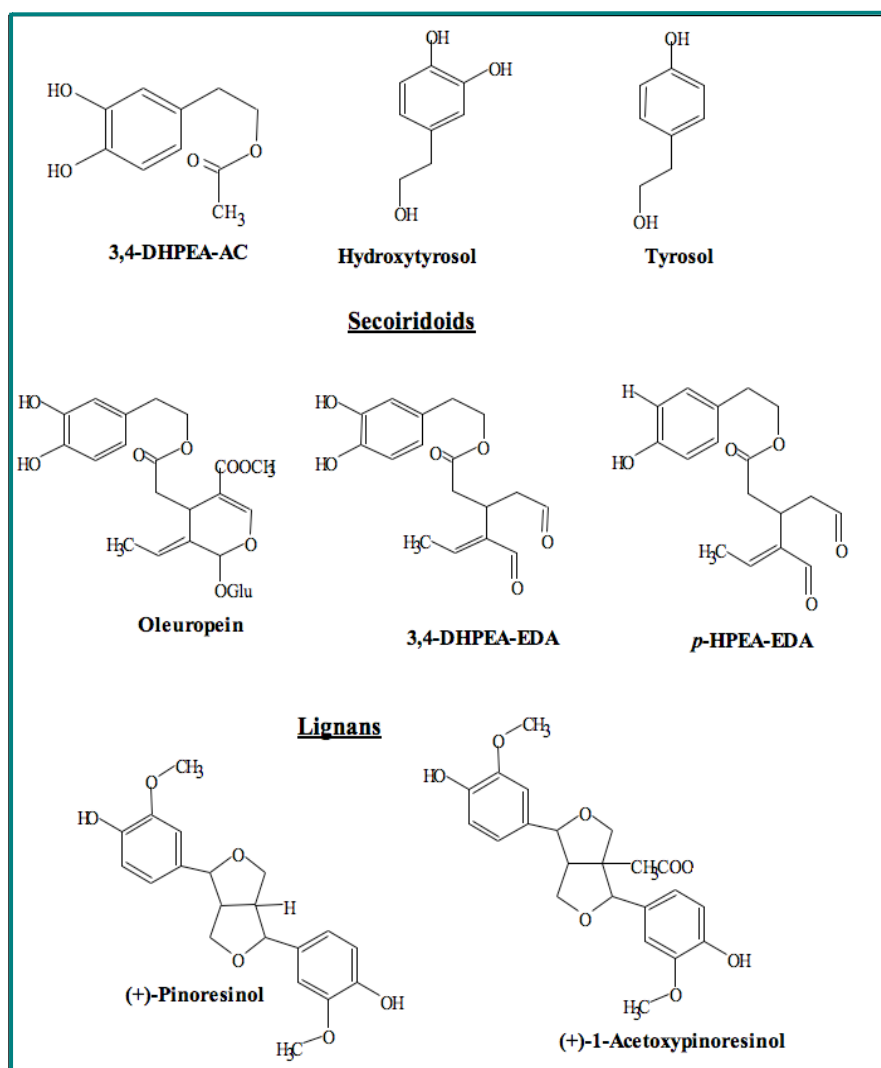
To fill those gaps, the antioxidant effect of 21 different phenolic compounds of olive fruit and olive oil in the oxidation of apolipoprotein of human LDL was assessed in this study. For that purpose, the quantification of carbonyl groups (detected by Western-Blot) was carried out in LDL-model systems. The antioxidant behavior of the most active phenols was then further characterized by measuring the protection of the lipidome changes induced by  $\text{Cu}^{++}$ , the accumulation of specific oxidation and lipid peroxidation markers in LDL apoproteins. Finally, the preventive role on the loss of cell viability induced by  $\text{Cu}^{++}$ -treated LDL was tested using these olive-derived phenolic compounds.

## MATERIALS AND METHODS

### *Phenolic compounds*

Reference Compounds. *α*-Tocopherol was purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co.. Phenolic standards from the following sources were used without further purification: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,5-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-chromen-7-one (rutin), 4',5,7-trihydroxyflavone (apigenin), apigenin 7-*O*-glucoside, 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone (luteolin), luteolin 7-*O*-glucoside, *trans*-4-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid), 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl alcohol (OH-tyrosol) (3,4-DHPEA), 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl alcohol (tyrosol) (*p*-HPEA), oleuropein, verbascoside and vanillin from Extrasynthese (Genay, France); 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), ferulic acid, and 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid) from Fluka Co. (Buchs, Switzerland); Pinoresinol from Arbonova Sales (Turku, Finland).

Isolated Phenolic Compounds from Olive Oil by Semipreparative HPLC. Secoiridoid derivatives 4-(acetoxylethyl)-1,2-dihydroxybenzene (3,4-DHPEA-AC), 4-hexenoic acid, 4-formyl-3-(2-oxoethyl)-2-(3,4 dihydroxyphenyl) ethyl ester (3,4-DHPEA-EDA), methylated form of the oleuropein aglycone (ME 3,4-DHPEA-EA) and 4-hexenoic acid, 4-formyl-3-(2-oxoethyl) 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl ester (*p*-HPEA-EDA) were isolated from virgin olive oil phenolic extract by semi-preparative HPLC method according to the method of Artajo et al. [20]. Stock solutions of commercial standards and phenolic compounds isolated from virgin olive oil were dissolved in MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) and stored at -40° C before the evaluation of their antioxidant activity. The chemical structures of the phenols included in the study are shown in **Figure 8.2 1**.





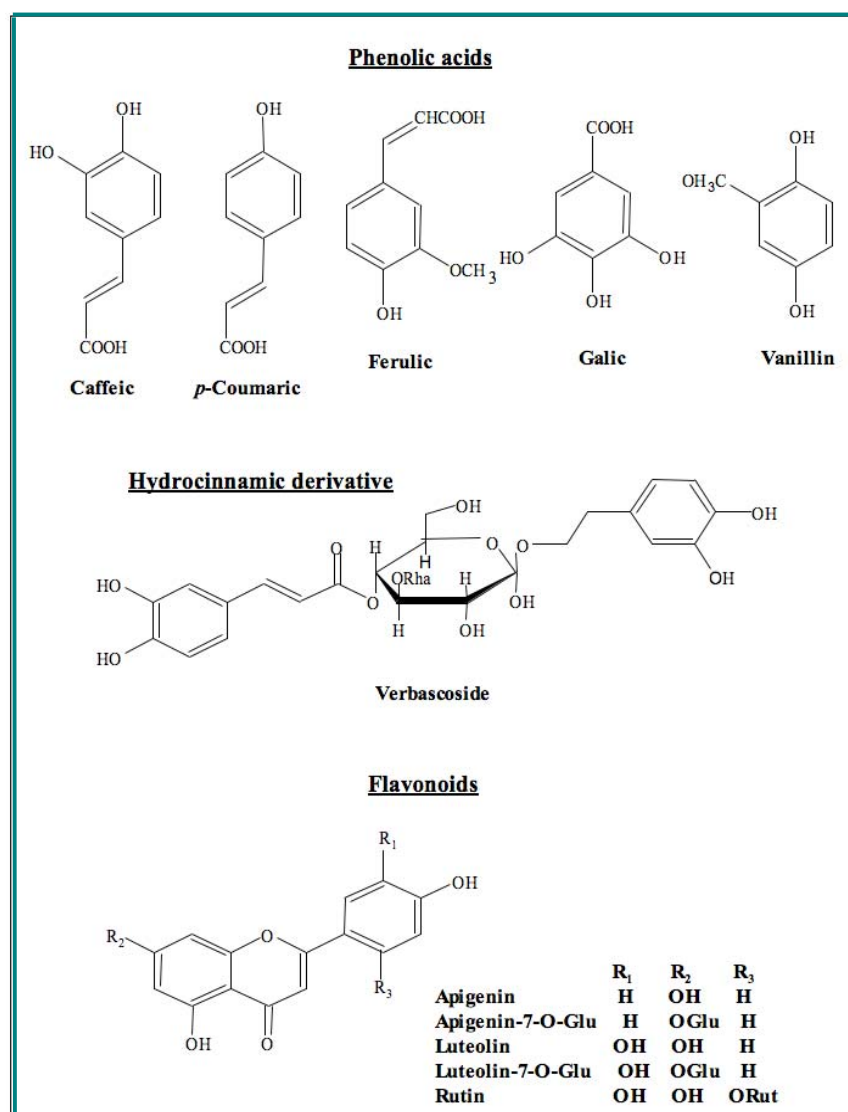


Figure 8.2.1. Structures of olive-derived polyphenols used in this study.

### *Protein oxidation screening method: Oxidation of LDL and Western blot analysis.*

Aliquots of polyphenolic compounds dissolved in methanol were transferred to Eppendorf tubes and desiccated under a nitrogen current at room temperature. The dried polyphenols were redissolved to a final concentration of 5  $\mu\text{M}$  with PBS containing 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LDL protein (Sigma). The LDL was oxidized by exposure to  $\text{CuSO}_4$  (5  $\mu\text{mol}/\text{l}$  free  $\text{Cu}^{++}$ ) in PBS at 37° C for 4 hours. All samples were used immediately or stored at -80° C for further analysis.

To assess the extent of LDL apoprotein oxidation, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP)-reactive carbonyls were measured by western blot as previously described[21]. Briefly, to 15  $\mu\text{l}$  of

sample SDS was added to a final concentration of 6%, and, after boiling for 3 min, 20  $\mu$ l of 10 mM DNP in 10% trifluoroacetic acid were added. After 7 min at room temperature, 20  $\mu$ l of a solution containing 2M Tris base, 30% glycerol and 15%  $\beta$ -mercaptoethanol was added for neutralization and sample preparation for loading onto 4-20% gradient pre-made SDS-PAGE gels (Invitrogen). For immunodetection after SDS-PAGE, proteins were transferred using a Mini Trans-Blot Transfer Cell (BioRad) to PVDF membranes (Immobilon-P Millipore, Bedford, MA). Immunodetection was performed using a rabbit anti-DNP antiserum as the primary antibody (1:4000, Dako, Carpinteria, CA). Peroxidase-coupled secondary antibodies were used from the Tropix chemiluminescence kit (Tropix Inc, Bedford, MA). Luminiscence was recorded and quantified in Chemidoc equipment (Biorad, Barcelona, Spain), using the Quantity-one analysis software (Biorad). The average mode of background subtraction was chosen to quantify. Control experiments showed that omission of derivatization step, primary or secondary antibody addition produced blots with no detectable signal (data not shown). After developing, the blots were silver-stained as described to check the protein load.[21]

#### *Measurement of glutamic (GSA) and amino adipic (AASA) semialdehydes and malondialdehyde lysine (MDAL).*

GSA, AASA, and MDAL concentrations in LDL apoproteins were quantified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) as previously described [21]. Samples containing 0.4 mg of protein were extensively delipidated using chloroform:methanol extraction (2:1 v/v, 3x) in the presence of 0.01% butylated hydroxytoluene, and the proteins were precipitated by adding 10% of trichloroacetic acid (final concentration) and subsequent centrifugation. The protein samples were reduced overnight with 500 mM NaBH<sub>4</sub> (final concentration) in 0.2M borate buffer, pH 9.2, containing 1 drop of hexanol as an anti-foam reagent. The proteins were then reprecipitated by adding 1 ml of 20% trichloroacetic acid and then centrifuging. The following isotopically labelled internal standards were then added: [2H8]Lysine (d8-Lys; CDN Isotopes); and [2H8]MDAL (d8-MDAL), [2H5] 5-hydroxy-2-aminovaleric acid (for GSA quantization) and [2H4]6-hydroxy-2-aminocaproic acid (for AASA quantization) as described[21]. The samples were hydrolysed at 155° C for 30 min in 1ml of 6N HCl, and then vacuum dried. The N,O-trifluoroacetyl methyl ester derivatives of the protein hydrolysate were prepared as previously described [21]. The GC/MS analyses were carried out on a Hewlett-Packard model 6890 gas chromatograph equipped with a 30m HP-5MS capillary column (30m x 0.25mm x 0.25  $\mu$ m) coupled to a Hewlett-Packard model 5973A mass selective detector (Agilent, Barcelona, Spain). The injection port was maintained at 275° C; the temperature program was 5 min at 110° C, then rising by 2° C/min to 150° C, then by 5° C/min to 240° C, then 25° C/min to 300° C, and finally hold at 300° C for 5 min. Quantification was performed by external standardization using standard curves constructed from mixtures of deuterated and non-deuterated standards. The analytes were detected by selected ion-monitoring GC/MS. The ions used were: lysine and d8-lysine, m/z 180 and 187, respectively; 5-hydroxy-2-aminovaleric acid and d5-5-hydroxy-2-aminovaleric acid (stable derivatives of GSA), m/z 280 and 285, respectively; 6-hydroxy-2-aminocaproic acid and d4-6-hydroxy-2-aminocaproic acid (stable derivatives of AASA), m/z 294 and 298, respectively; and MDAL and

d8-MDAL,  $m/z$  474 and 482, respectively. The amounts of products were expressed as the ratio  $\mu\text{mol GSA, AASA, or MDAL/mol lysine}$ .

### Lipidome analyses.

Lipid composition was assessed by fatty acid analysis and time of flight mass spectrometry (TOF)-based lipid molecular species analyses. The total lipids from LDL were extracted with chloroform:methanol (2:1, v/v) in the presence of 0.01% butylated hydroxytoluene.

Fatty acid analysis was performed as previously described[21]. The chloroform phase was evaporated under nitrogen, and the fatty acids were transesterified by incubation in 2.5 ml of 5% methanolic HCl for 90 min at 75° C. The resulting fatty acid methyl esters were extracted by adding 2.5 ml of n-pentane and 1 ml of saturated NaCl solution. The n-pentane phase was separated, evaporated under nitrogen, redissolved in 75  $\mu\text{l}$  of hexane and 1  $\mu\text{l}$  was used for the GC/MS analysis. Separation was performed in a SP2330 capillary column (30m x 0.25mm x 0.20 $\mu\text{m}$ ) in a Hewlett Packard 6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain). A Hewlett Packard 5973A mass spectrometer was used as the detector in the electron-impact mode. The injection port was maintained at 220° C, and the detector at 250° C; the temperature program was 2 min at 100° C, then rising by 10° C/min to 200° C, then 5° C/min to 240° C, and finally held at 240° C for 10 min. Identification of fatty acid methyl esters was done by comparison with authentic standards and based on mass spectra. Results are expressed as mol %. The following indexes were calculated from the fatty acid composition: Saturated Fatty Acids (SFA)=  $\Sigma$  % of saturated fatty acids; Unsaturated Fatty Acids (UFA)=  $\Sigma$  % unsaturated fatty acids; Monounsaturated Fatty Acids (MUFA)=  $\Sigma$  % of monoenoic fatty acids; Polyunsaturated n-3 Fatty Acids (PUFAn-3)=  $\Sigma$  % of polyunsaturated fatty acids n-3 serie; Polyunsaturated n-6 Fatty Acids (PUFAn-6)=  $\Sigma$  % of polyunsaturated fatty acids n-6 serie; Average Chain Length (ACL)=  $[(\Sigma \text{ \%Total}_{14} \times 14) + \dots + (\Sigma \text{ \%Total}_n \times n)]/100$  (n= carbon atom number); Peroxidizability index =  $[(\Sigma \text{ mol\% Monoenoic} \times 0.025) + (\Sigma \text{ mol\% Dienoic} \times 1) + (\Sigma \text{ mol\% Trienoic} \times 2) + (\Sigma \text{ mol\% Tetraenoic} \times 4) + (\Sigma \text{ mol\% Pentaenoic} \times 6) + (\Sigma \text{ mol\% Hexaenoic} \times 8)]$ .

For TOF-based lipid molecular species analyses, lipid extracts were submitted to mass-spectrometry using a 6210 Agilent Q-TOF, coupled to a capillary LC module using an untargeted approach as described recently [22]. Briefly, lipid samples, extracted as above, after drying and reconstitution under N<sub>2</sub> were injected into a reverse phase chromatography system, using a Zorbax C18 column (150 x 0.5 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) at a flow rate of 8  $\mu\text{l/min}$  in a LC system consisting of a capillary pump (Agilent 1200). Buffer A was water with 0.1% formic acid, and buffer B was acetonitrile with 0.1% formic acid. The column was equilibrated in 5% B and the gradient was 5%--95%B over 50 min. The eluant was directed to an ESI source, with a nebulizer gas flow of 15 l/min at 300° C with a capillary voltage of 3500 V operating in positive mode, with a dual spray for reference mass ( $m/z$  121.05087 and  $m/z$  922.0098). The instrument was calibrated immediately prior to the test. For the data analysis with the Agilent MassHunter Profiling software, five repeated injections of each extract sample were measured by the same LC/MS method. The acquired MS data were extracted by the Molecular Feature Extractor in the Agilent MassHunter Qualitative software. In this process, the identified ions were clustered to molecular features comprising isotope compounds and adducts. The obtained files were

grouped according to the samples into two respective groups (control samples vs Cu<sup>++</sup> treated samples) and loaded into the Agilent MassHunter Profiling software. For the differential analysis of both groups the features of each group were compared using Student's T test. The resulting masses were searched for in the Lipid Maps Databases (<http://www.lipidmaps.org/tools/index.html>), and among 73 different molecular features found, 17 were significantly increased ( $p < 0.01$ ) over values found in control incubations of LDL. Among those, the three most abundant had masses compatible with 1-palmitoyllysophosphatidylcholine -PLPC- (measured mass: 495.3328, theoretical mass: 495.3325), 1-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine -SGPC- (measured mass: 523.364, theoretical mass: 523.3638) and 1-oleoylglycerophosphocholine -OGPC- (measured mass: 521.3476, theoretical mass: 521.3481). In order to offer a relative quantification of 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleryl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) and 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC), bioactive lipids present in oxLDL mass profiles [23] were integrated for an  $m/z$  of 594.3 for POVPC and 610.2 for PGPC with a  $\Delta$  of 0.01 Da.

### *Cell viability.*

HMVEC cells, kindly donated by Dr. A. Negre-Salvayre (INSERM, Toulouse, France) were cultured in 100mm plates with high glucose DMEM containing 10% FBS until they were 70-80% confluent. Afterwards, the cells were harvested, counted and seeded in 96-well microplates (25,000 cells/well) with the same culture medium, leaving a strip of wells free of cells to be used as a blank. The cells were immediately centrifuged at 1000 rpm for 4 min, without stop brake, in order to obtain a fast and homogeneous attachment to the bottom of the wells. After 6 h, the cell culture medium was removed and serum-free DMEM was added to the cells. One hour later, the culture medium was removed again and 100  $\mu$ l of serum-free DMEM containing non-oxidized LDL, oxLDL, oxLDL in the presence of polyphenols or the vehicles alone, was added to each well. The final concentration of LDL in all conditions was 200  $\mu$ g/ml. Eighteen hours later, the culture medium was removed and 100  $\mu$ l of PBS was added to each well in order to avoid possible interferences, immediately before determining viability. The effect of polyphenols on the cellular capacity to withstand tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) challenge was measured as described [24,25]. The HepG2 cells were serum starved (0.5% FCS) in the presence of selected phenolics (5  $\mu$ M) for 8 h. The cells were then challenged with 200  $\mu$ M t-BOOH as peroxide donor, and 2 h later, cell viability was estimated with the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test.

Both HMEC and HepG2 viability were measured with the MTT-based Cell Toxicity Colorimetric Assay Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as the percentage of viability versus cells exposed to non-oxidized LDL or untreated with t-BOOH.

### *Statistical analyses.*

All statistics were analyzed using the SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL). Differences between the groups were analyzed by the Student's T tests or ANOVA (with post-hoc analyses

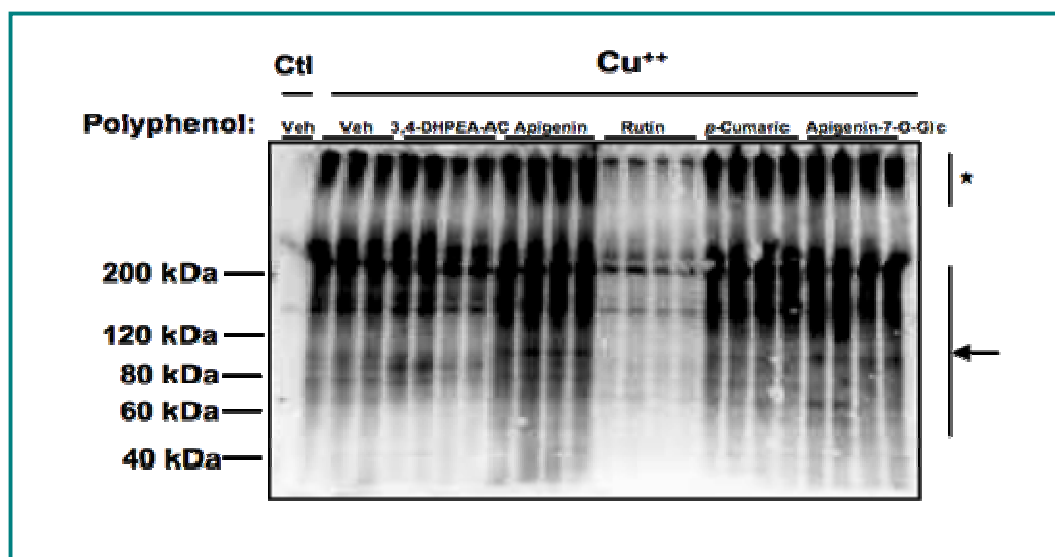
for detecting differences between specific pairs), after assessment of normal distribution of variables by the Kolmogorov-Smirnoff test. Correlations between variables were evaluated by the Pearson statistic. The 0.05 level was selected as the point of minimal statistical significance in every comparison.

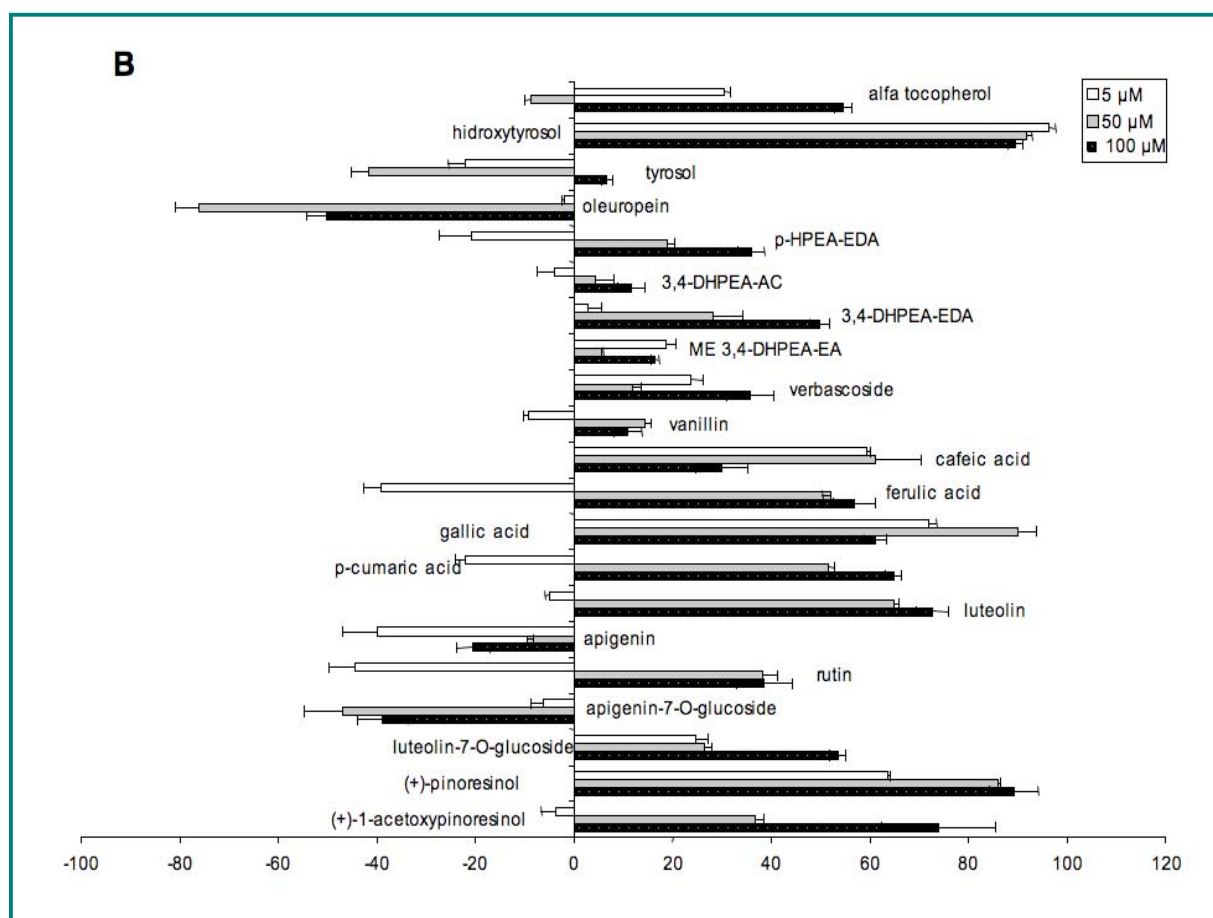
## RESULTS

### *Effect of individual phenolic compounds on LDL oxidation.*

The antioxidant capacity was quantified after western-blot of DNP reactive carbonyls in LDL apoprotein (**Figure 8.2 2**) the value corresponding to oxLDL being considered 0 % of antioxidant capacity. Positive percentage values corresponded to antioxidant capacity, corresponding to anti-DNP immunoreactivities below the oxLDL. Negative percentage values corresponded to prooxidant activities, showing higher values than OxLDL. The results of the percentage of the oxidation inhibition of the different phenols tested at three concentrations, 5, 50 and 100  $\mu\text{M}$ , are shown in **Figure 8.2 2B**, using  $\alpha$ -tocopherol as reference. Apoprotein oxidation was significantly inhibited by the majority of the phenols tested. The OH-tyrosol showed the maximal efficiency even at 5  $\mu\text{M}$ , higher than the efficiency of  $\alpha$ -tocopherol. Luteolin (flavonoid), pinoresinol (lignan), gallic and caffeic acids showed a good efficiency that was concentration-dependent. These phenols reduced the  $\text{Cu}^{++}$  induced oxidation by between 60 and 80%. The secoiridoid derivatives (3,4-DHPEA-EDA and *p*-HPEA-EDA) showed a slight activity, similarly to  $\alpha$ -tocopherol. Other phenols, such as verbascoside, vanillin, 3,4-DHPEA-AC and the methylated form of the oleuropein aglycone (ME 3,4-DHPEA-EA) showed lower antioxidant activity with oxidation inhibition values below 20 %. The prooxidant effect shown by some phenols, such as oleuropein, tyrosol and apigenin in its aglycone and glucosidic forms should also be noted.

**A**





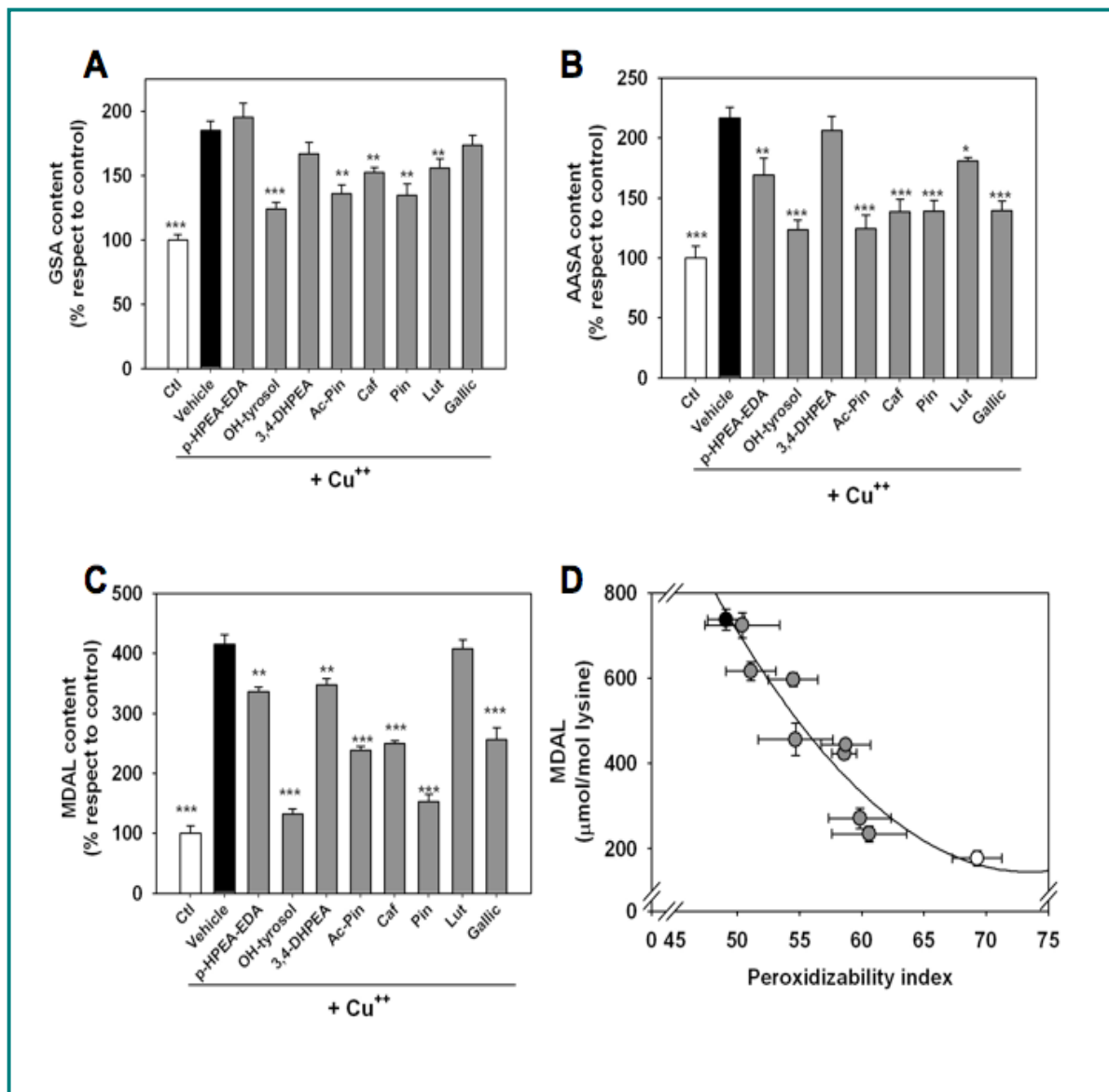
**Figure 8.2 2.** Olive-derived polyphenols inhibit protein oxidation in oxLDL to varying degrees. **A.** Representative western-blot of the screening phase for LDL apoprotein protection in oxLDL. Data are presented for 3,4-DHPEA-AC, apigenin, rutin, *p*-cumaric acid and apigenin-7-O-glucoside at 100  $\mu$ M. Veh:Vehicle, \* indicates Apo B-100 molecular weight and arrow indicates protein fragmentation induced by oxidation. **B:** Effect of olive-derived polyphenols in protein carbonylation in  $\text{Cu}^{++}$ -incubated LDL. All phenols were tested at three concentrations (5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M). LDL and  $\text{Cu}^{++}$  incubated LDL were used as control of native and oxidized LDL. The antioxidant capacity of each phenol at different concentrations is expressed as percentual values, considering that the immunoreactivity of  $\text{Cu}^{++}$ -incubated LDL is considered 0 % of antioxidant capacity -positive values reveal decreased carbonyl formation and negative values reveal increased protein carbonylation-. Data shown are mean $\pm$ S.D., (n=4 for each data point).

As **Figure 8.2 2** shows, different phenolic compounds exhibit differential effects in a dose dependent fashion, over the potential for the formation of 2,4- DNPH reactive carbonyls, a surrogate of protein oxidation, in the apoprotein moiety of human LDL. According with this first screening, the more active phenols selected were: OH-tyrosol (OH-tyrosol), 3,4-DHPEA-

EDA, *p*-HPEA-EDA as secoiridoid derivatives; 1-acetoxypinoresinol (Ac-Pin) and pinoresinol (Pin) as the lignan group; luteolin (Lut) as a flavonoid; and caffeic (Caf) and gallic (Gallic) acids as phenolic acids.

*Cu<sup>++</sup> incubation induces accumulation of metal-catalyzed oxidation (MCO) and lipoxidation markers in LDL apoproteins: differential inhibitory potential of polyphenolic compounds.*

Taking into account that DNP reactive carbonyls could arise from either lipid peroxidative damage or the direct modification of aminoacid residues by MCO [26], specific probes for each of these oxidative modifications were measured by using GC/MS. The results show that Cu<sup>++</sup> incubation led to significant increases in the MCO markers GSA, AASA and an even greater increase in the lipoxidation marker MDAL (**Figure 8.2 3**). OH-tyrosol and the lignans were the most effective compounds for inhibiting GSA accumulation. Caffeic acid and luteolin also prevented its accumulation in Cu<sup>++</sup>-treated LDL. Neither gallic acid, nor *p*-HPEA-EDA or 3,4-DHPEA-EDA were effective (**Figure 8.2 3A**). A similar pattern was observed for AASA accumulation, but in this case, both gallic acid and the *p*-HPEA-EDA were significant inhibitors of its formation (**Figure 8.2 3B**). Finally, OH-tyrosol and pinoresinol were potent antioxidants in considering MDAL accumulation, while *p*-HPEA-EDA and 3,4-DHPEA-EDA, and specially luteolin (with no significant effect), were among the lowest in this sense (**Figure 3C**). To reinforce the importance of the lipid composition in relation with the lipoxidative modifications of proteins, a significant correlation was observed ( $r^2=0.91$ ;  $p<0.0001$ ) between peroxidizability index (PI) (see below) and MDAL formation (**Figure 8.2 3D**).



**Figure 8.2 3.** Proteins from  $\text{Cu}^{++}$ -incubated LDL show significant increases in the amounts of oxidation markers whose formation is inhibited by selected olive-derived polyphenols. A-C show GC/MS analyses of GSA and AASA (markers of metal-catalyzed oxidation), and MDAL, originated from lipoxidation. Values shown are % changes of mean  $\pm$  S.E.M. over values from control LDL (GSA:  $5945 \pm 61$   $\mu\text{mol/mol}$  lysine; AASA:  $1128 \pm 20$   $\mu\text{mol/mol}$  lysine; and MDAL:  $177 \pm 23$   $\mu\text{mol/mol}$  lysine); \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  and \*\*\*  $p < 0,001$  respect to  $\text{Cu}^{++}$  incubated LDL. D: protein lipoxidative damage shows a quadratic relationship with peroxidizability index (PI) ( $r^2 = 0,911$ ;  $p < 0,0001$ ; model:  $[\text{MDAL}] = 1,03 \cdot [\text{PI}]^2 - 151,26 \cdot [\text{PI}] + 5698$ )



### *Effect of selected polyphenolics in Cu<sup>++</sup>-induced changes in LDL fatty acid composition and derived indexes.*

Carbonyl modification of apoproteins can arise from lipid peroxidation. In such a case, the LDL fatty acid composition exhibits polyunsaturated fatty acid consumption. To test this, the fatty acid composition of LDL was analyzed after Cu<sup>++</sup>-induced oxidation, demonstrating significant losses in PI and PUFA content (**Table 8.2 1**). For this reason we examined the potential for prevention of this phenomenon. OH-tyrosol, caffeic acid and lignanes were among the most potent compounds, almost preventing the effect of Cu<sup>++</sup>. The phenolic acids and *p*-HPEA-EDA were less potent, and luteolin and 3,4-DHPEA-EDA had almost no effect on the oxidative modification of LDL lipids.

### *Effects of polyphenolics in lipidome changes induced by Cu<sup>++</sup>: prevention on the accumulation of biologically active oxidized phospholipids.*

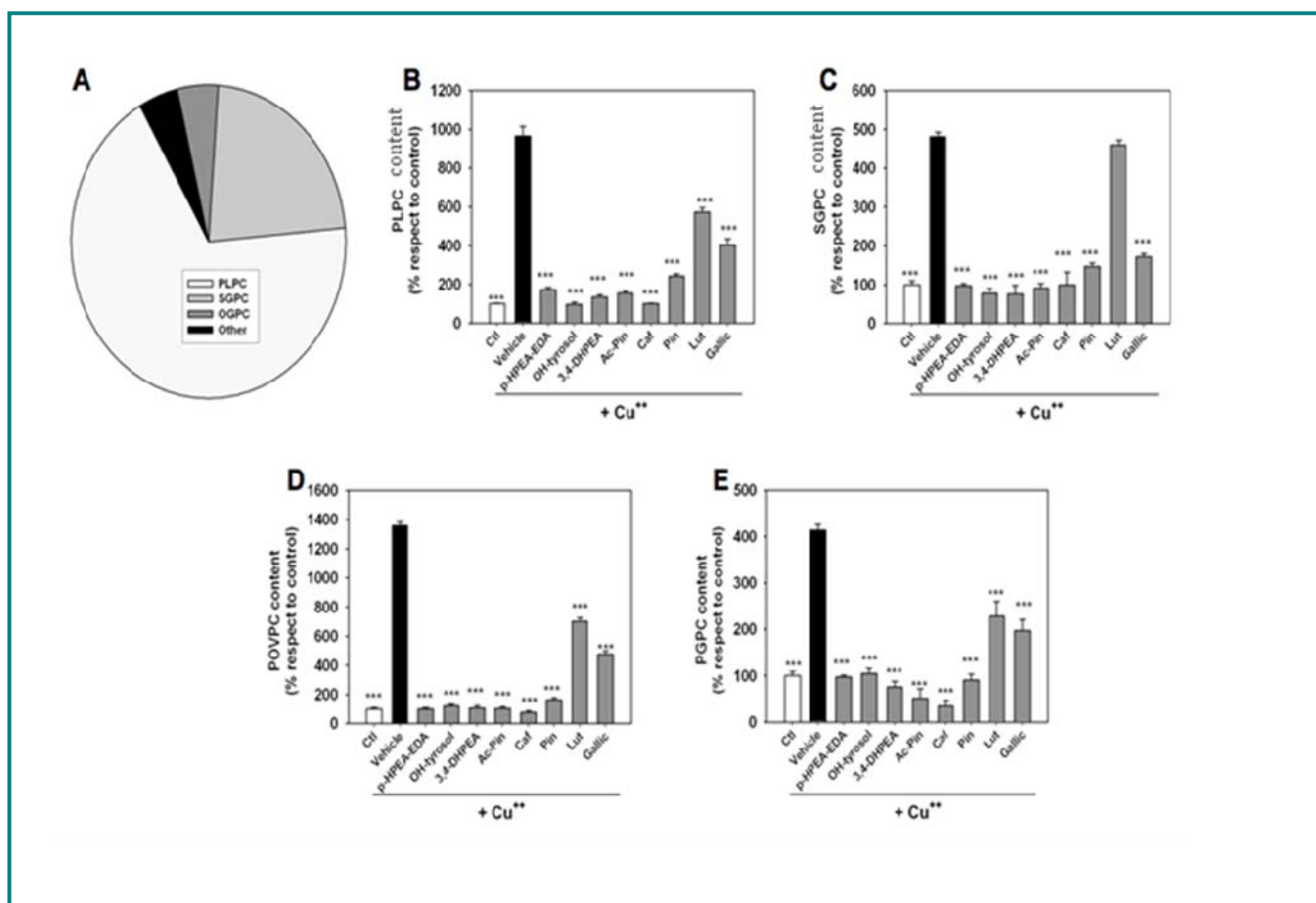
After TOF-based analyses of oxLDL, palmitoyllysophosphatidylcholine (PLPC), 1-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SGPC) and 1-oleoylglycerophosphocholine (OGPC) comprised more than 90% of the differentially present lipids in Cu<sup>++</sup>-treated LDL (**Figure 8.2 4A**). Similarly to the fatty acid analyses, luteolin and gallic acid exhibit the lowest capacity for preventing the build-up of PLPC, while the other compounds prevented the accumulation of this compound almost completely. Luteolin was the only compound unable to inhibit the formation of SGPC (**Figures 8.2 4B and 4C**).

Taking into account that 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleryl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) and 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) have been identified as biological effectors of oxLDL [23], the presence of those compounds was ensured. As expected, their level increased in Cu<sup>++</sup>-treated samples (12 and 4-fold over untreated samples, respectively). Similarly, luteolin and gallic acid prevented the accumulation PLPC to a lower extent when compared with the other compounds (**Figures 8.2 4D and 4E**).

Table 8.2 1. Effect of Cu<sup>++</sup> and phenolic in LDL fatty acid composition.

	3,4-DHPEA-OH		p-HPEA-OH		Cu <sup>++</sup>		EDA		Tyrosol		EDA		Ac-Pin		Caffeic		Pin		Lut		Gall		
	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	ED	DA	
.16:0	21,11±0,59*	24,78±0,78	24,92±0,79	24,92±0,79	24,92±0,79	24,92±0,79	24,92±0,79	24,92±0,79	23,39±0,84	24,77±0,8	23,85±0,09	23,85±0,09	23,85±0,09	23,85±0,09	23,85±0,09	23,85±0,09	23,85±0,09	23,32±0,10	23,32±0,10	26,55±0,91	26,55±0,91	24,25±0,65	24,25±0,65
16:1n-7	3,06±0,28*	3,27±0,55	3,15±0,93	3,15±0,93	3,15±0,93	3,15±0,93	3,15±0,93	3,15±0,93	3,00±0,66*	3,10±0,7	3,59±0,59	3,59±0,59	3,59±0,59	3,59±0,59	3,59±0,59	3,59±0,59	3,59±0,59	3,26±0,15	3,26±0,15	3,33±0,26	3,33±0,26	3,25±0,87	3,25±0,87
.18:0	11,55±0,16	11,08±0,93	8,99±0,72*	8,99±0,72*	8,99±0,72*	8,99±0,72*	8,99±0,72*	8,99±0,72*	8,90±0,30*	11,41±0,0	8,67±0,68*	8,67±0,68*	8,67±0,68*	8,67±0,68*	8,67±0,68*	8,67±0,68*	8,67±0,68*	9,36±0,46*	9,36±0,46*	11,63±0,35	11,63±0,35	10,08±0,41	10,08±0,41
.18:1n-9	22,77±0,97**	26,38±0,26	25,29±0,06	25,29±0,06	25,29±0,06	25,29±0,06	25,29±0,06	25,29±0,06	24,91±0,27	25,74±0,0	24,44±0,49	24,44±0,49	24,44±0,49	24,44±0,49	24,44±0,49	24,44±0,49	24,44±0,49	24,61±0,69	24,61±0,69	25,37±0,06	25,37±0,06	25,24±0,93	25,24±0,93
.18:2n-6	28,84±0,50**	24,97±0,21	29,41±0,43**	29,41±0,43**	29,41±0,43**	29,41±0,43**	29,41±0,43**	29,41±0,43**	30,39±0,33**	26,09±0,9*	30,47±0,14**	30,47±0,14**	30,47±0,14**	30,47±0,14**	30,47±0,14**	30,47±0,14**	30,47±0,14**	29,78±0,13**	29,78±0,13**	23,11±0,81	23,11±0,81	28,02±0,8**	28,02±0,8**
.20:3n-6	1,59±0,47*	0,98±0,07	1,13±0,214*	1,13±0,214*	1,13±0,214*	1,13±0,214*	1,13±0,214*	1,13±0,214*	1,39±0,85*	1,01±0,1	1,17±0,11*	1,17±0,11*	1,17±0,11*	1,17±0,11*	1,17±0,11*	1,17±0,11*	1,17±0,11*	1,24±0,22*	1,24±0,22*	0,88±0,02	0,88±0,02	1,18±0,14*	1,18±0,14*
.20:4n-6	6,05±0,96**	3,08±0,70	3,79±0,50	3,79±0,50	3,79±0,50	3,79±0,50	3,79±0,50	3,79±0,50	4,62±0,19*	3,32±0,6	4,14±0,82*	4,14±0,82*	4,14±0,82*	4,14±0,82*	4,14±0,82*	4,14±0,82*	4,14±0,82*	4,29±0,65*	4,29±0,65*	2,67±0,25	2,67±0,25	3,77±0,14*	3,77±0,14*
ACL	17,74±0,9	17,5±0,7	17,5±0,5	17,5±0,5	17,5±0,5	17,5±0,5	17,5±0,5	17,5±0,5	17,6±0,2	17,5±0,7	17,5±0,7	17,5±0,7	17,5±0,7	17,5±0,7	17,5±0,7	17,5±0,7	17,5±0,7	17,6±0,1	17,6±0,1	17,5±0,1	17,5±0,1	17,5±0,8	17,5±0,8
SFA	34,41±1,2	38,1±0,3	35,3±0,9*	35,3±0,9*	35,3±0,9*	35,3±0,9*	35,3±0,9*	35,3±0,9*	33,8±0,0*	37,9±0,8	34,2±0,4*	34,2±0,4*	34,2±0,4*	34,2±0,4*	34,2±0,4*	34,2±0,4*	34,2±0,4*	34,6±0,3*	34,6±0,3*	40,2±0,6*	40,2±0,6*	36,1±0,4	36,1±0,4
UFA	65,59±2,2*	61,8±1,7	64,6±2,1*	64,6±2,1*	64,6±2,1*	64,6±2,1*	64,6±2,1*	64,6±2,1*	66,2±1,0*	62,0±2,2	65,7±0,6*	65,7±0,6*	65,7±0,6*	65,7±0,6*	65,7±0,6*	65,7±0,6*	65,7±0,6*	65,4±1,2*	65,4±1,2*	59,7±0,4	59,7±0,4	63,8±0,6	63,8±0,6
MUFA	26,07±0,7*	30,3±0,5	28,7±0,3*	28,7±0,3*	28,7±0,3*	28,7±0,3*	28,7±0,3*	28,7±0,3*	28,0±0,2*	29,0±0,2	28,1±0,3*	28,1±0,3*	28,1±0,3*	28,1±0,3*	28,1±0,3*	28,1±0,3*	28,1±0,3*	28,0±0,2*	28,0±0,2*	28,8±0,8	28,8±0,8	28,7±0,1	28,7±0,1
PUFA	39,52±0,8**	31,5±0,2	35,8±0,7*	35,8±0,7*	35,8±0,7*	35,8±0,7*	35,8±0,7*	35,8±0,7*	38,2±0,1**	33,0±0,0	37,6±0,4*	37,6±0,4*	37,6±0,4*	37,6±0,4*	37,6±0,4*	37,6±0,4*	37,6±0,4*	37,4±0,2*	37,4±0,2*	30,8±0,6	30,8±0,6	35,1±0,6*	35,1±0,6*
PUFAn-3	1,67±0,02*	0,9±0,08	0,9±0,07	0,9±0,07	0,9±0,07	0,9±0,07	0,9±0,07	0,9±0,07	1,2±0,1	1,0±0,7	1,1±0,6	1,1±0,6	1,1±0,6	1,1±0,6	1,1±0,6	1,1±0,6	1,1±0,6	1,3±0,1	1,3±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	1,0±0,5	1,0±0,5
PUFAn-6	37,85±1,2*	30,5±0,4	34,9±0,1*	34,9±0,1*	34,9±0,1*	34,9±0,1*	34,9±0,1*	34,9±0,1*	36,9±0,9*	31,9±0,3	36,4±0,8*	36,4±0,8*	36,4±0,8*	36,4±0,8*	36,4±0,8*	36,4±0,8*	36,4±0,8*	36,1±0,1*	36,1±0,1*	30,05±0,1	30,05±0,1	34,1±0,1*	34,1±0,1*
DBI	124,58±3,2**	104,6±0,6	112,5±0,8*	112,5±0,8*	112,5±0,8*	112,5±0,8*	112,5±0,8*	112,5±0,8*	119,0±0,6**	106,6±0,5	117,0±0,1**	117,0±0,1**	117,0±0,1**	117,0±0,1**	117,0±0,1**	117,0±0,1**	117,0±0,1**	117,3±0,7**	117,3±0,7**	103,2±0,0	103,2±0,0	111,6±0,8*	111,6±0,8*
PI	69,26±2,3**	49,1±0,1	54,5±0,5*	54,5±0,5*	54,5±0,5*	54,5±0,5*	54,5±0,5*	54,5±0,5*	60,6±0,1**	51,1±0,1	58,6±0,2*	58,6±0,2*	58,6±0,2*	58,6±0,2*	58,6±0,2*	58,6±0,2*	58,6±0,2*	59,8±0,6*	59,8±0,6*	50,4±0,2	50,4±0,2	54,6±0,9*	54,6±0,9*

Values: mean±S.E. ACL, average chain length; SFA, saturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids; PUFA n-6/n-3, polyunsaturated fatty acids n-6 or n-3 series; MUFA, monounsaturated fatty acids; DBI, double bond index; PI, peroxidizability index, \*p<0,05 and \*\* p<0,01 respect to values in Cu<sup>++</sup> incubated LDL by ANOVA post-hoc analyses (n=4 for each data point).



**Figure 8.2 4.** Olive-derived polyphenols inhibit changes in LDL lipidome induced by Cu<sup>++</sup>. A: Pie plot showing distribution of differential lipid species between control and Cu<sup>++</sup>-incubated LDL. B: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of PLPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. C: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of SGPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. D: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of POVPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. E: Effect of olive-derived polyphenols in the accumulation of PGPC induced by Cu<sup>++</sup>-incubation. Values shown are mean  $\pm$  S.E.M over values from Cu<sup>++</sup>-incubated LDL, \*\*\* p<0,001 (n=4 for each data point).

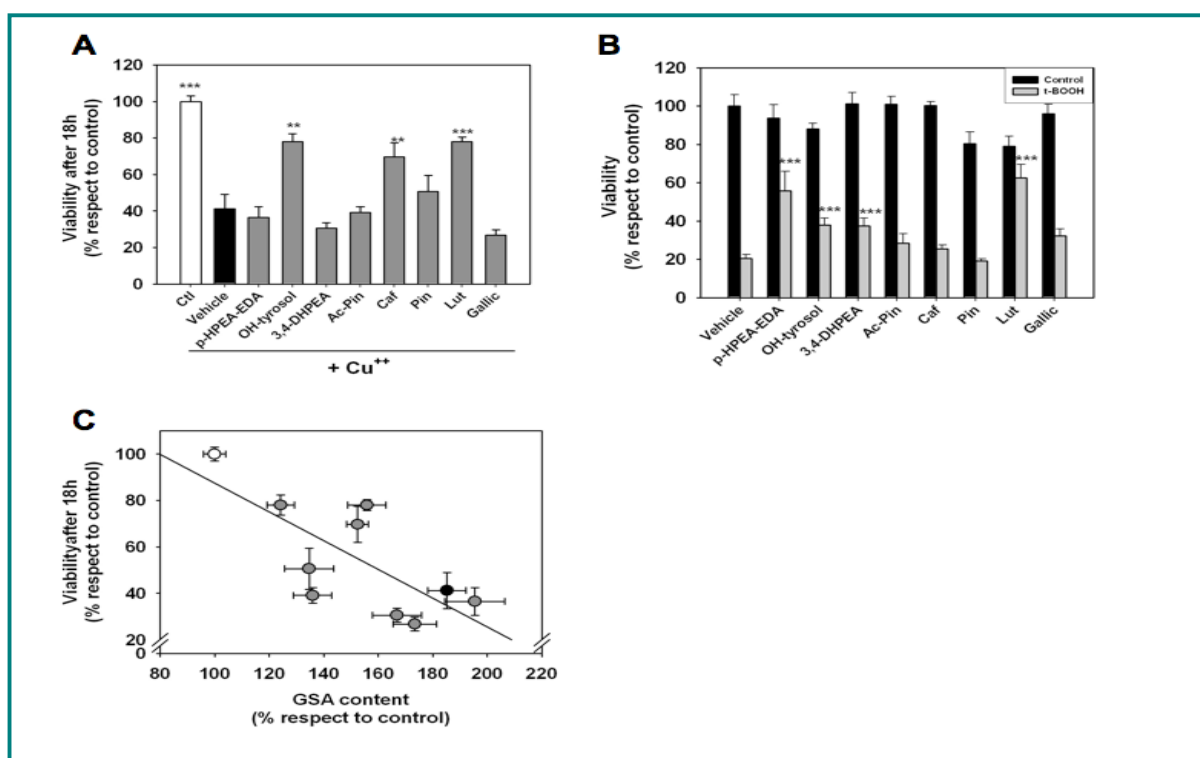
***Olive-derived phenolics prevent loss of cell viability induced by Cu<sup>++</sup>-treated LDL: relationship with protein oxidation.***

To further reinforce the biological relevance of the antioxidant potential of those compounds and the methodology described here for its identification, we examined the cytotoxic potential of Cu<sup>++</sup> incubated LDL in an endothelial cell culture. For this purpose, the endothelial cell line HMEC-1 was treated with Cu<sup>++</sup>-treated LDL and 18 h later, the viability of the cultures was assessed with the MTT assay. The results demonstrate that oxLDL led to a loss of 60% of viability and OH-tyrosol and caffeic acid prevented partially those effects (Figure 8.2 5A), inducing only a 10% of viability loss. Unexpectedly, luteolin, a compound with a low

antioxidant potential, showed a significant preventive effect on the oxLDL induced loss of viability.

To ascertain whether this was due to a cellular effect (e.g. by modulation of antioxidant cellular responses), we examined the potential influence of those compounds in *tert*-BOOH-mediated cell death in a HepG2 cell line, an unrelated cell line. Those analyses demonstrate that, apart from the secoiridoid derivatives, luteolin was the only compound able significantly to prevent the loss of viability secondary to treatment with *tert*-BOOH (**Figure 8.2 5B**).

The correlation of cell viability with antioxidant capacity reinforced the pathogenic importance of LDL apoprotein oxidative modification, as that GSA amount showed the most significant correlation with the loss of viability induced by oxLDL (**Figure 8.2 5C**).



**Figure 8.2 5** Olive-derived polyphenols inhibit to various extents oxidative-stress induced loss of viability in endothelial and hepatocyte cell-lines. **A:** Effect of olive-derived polyphenols in cell death in HMEC (endothelial cell line) induced by  $\text{Cu}^{++}$ -incubated LDL; \*\*  $p < 0,01$  and \*\*\*  $p < 0,001$  respect to cell death induced by  $\text{Cu}^{++}$  incubated LDL ( $n=6$  for each data point). Values shown are mean  $\pm$  S.E.M. over values from samples treated with control LDL **B:** Effect of olive-derived polyphenols in HepG2 capability to withstand t-BOOH induced cell death; \*\*\*  $p < 0,001$  respect to cell death induced by t-BOOH ( $n=6$  for each data point). Values shown are % changes of mean  $\pm$  S.E. over values from control samples. **C:** Endothelial cell death induced by  $\text{Cu}^{++}$ -incubated LDL is strongly correlated with GSA content ( $r=-0.734$ ;  $p < 0,016$  by the Pearson correlation test).

## DISCUSSION

The present work demonstrates the high heterogeneity of the antioxidant properties of olive-derived phenolics in LDL oxidation. We offer a novel approach for analyzing and screening the antioxidant properties of natural products over LDL modification, especially in its protein components. After a screening phase, eight different compounds were selected for further analysis. We demonstrated for the first time, the effect of those nutritional compounds on the accrual of structurally characterized markers of both protein (GSA, AASA and MDAL) and lipid peroxidation (POVPC, PGPC) in oxLDL. The pathogenic importance of LDL protein oxidation is shown by the fact that it was the only factor that correlated with oxLDL-induced cell death.

In order to establish whether structural features determine the effect on the resistance of LDL to copper-induced oxidation, the chemical structures of the phenolic compounds should be considered (**Figure 1**). Important differences in the protection of the apoprotein oxidation were observed in this study, similar to those observed by other authors using the lag time of LDL as oxidation marker [27,28]. The differences between those phenols are attributable to their chemical structure, e.g. OH-tyrosol possesses a 3,4-dihydroxy structure linked to an aromatic ring that confers the moiety with a higher proton dislocation, facilitating a higher scavenging activity than the one observed with tyrosol, which only has a hydroxyl group linked to an aromatic ring (**Figure 1**). The protective effect of the OH-tyrosol structure has biological relevance as OH-tyrosol and tyrosol are the most simple phenols detected in plasma and LDL after the ingestion of virgin olive oil [29]. It should be noted that OH-tyrosol, with the highest potential for inhibition of MDAL, has been previously described as a potent inducer of cellular antioxidant responses, both in oxLDL-induced and in tert-BOOH-induced cell stress [24][30]

The antioxidant capacity shown by oleuropein and its secoiridoid derivatives was quite different. The aglicon derivative of oleuropein (3,4-DHPEA-EDA) and the ligstroside derivative (*p*-HPEA-EDA) showed a positive result as antioxidants, mainly at the maximum concentration tested. These compounds exhibit a high selectivity for lipid-related changes since they mainly prevented Cu<sup>++</sup> induced changes in lipidome and MDAL in LDL. Although no previous results were available on lipid or protein antioxidant properties, 3,4-DHPEA-EDA is a compound of special interest because of its presence as one of the major phenolic antioxidant compounds in virgin olive oil. Moreover, is the most important source of OH-tyrosol in plasma, derived from the ingestion of virgin olive oil. In contrast with these data, a similar phenolic structure, the 3,4-DHPEA-AC showed no significant antioxidant activity in this system. This may be attributed to the potential proton dislocation due to double bonds in the elenolic structure in 3,4-DHPEA-EDA.

Reinforcing the importance of conjugation, oleuropein, or glucose-conjugated elenolic acid, showed the most remarkable prooxidant activity of all phenols included in the study in agreement with its previous reported pro-oxidant activities [31,32]. More interestingly, as oleuropein is considered a proapoptotic agent with potential use as an anti-tumoral agent [33,34], it may be suggested that those protein prooxidant properties could be involved in the beneficial effects of oleuropein.

Flavonoids from olive pulp and olive oil include flavonol glycosides such as rutin, flavones (apigenin and luteolin), and their glucosides (apigenin-7-*O*-glucoside and luteolin-7-*O*-glucoside). Polyphenolic flavonoids can scavenge reactive oxygen radicals, by donating a hydrogen atom or electron [35][36]. Their radical scavenging activity seems to be substantially dependent on three structural groups : (i) the *ortho*-dihydroxyl structure (catechol structure) in the B ring, which is the obvious radical target site, (ii) the 2,3 double bond in conjunction with 4-oxo function, which is responsible for electron delocalization, and (iii) the additional presence of both the 3- and the 5-OH groups for maximal radical scavenging potential and the strongest radical absorption. Our data suggest the importance of the *ortho*-dihydroxyl structure in the prevention of protein modification, as luteolin and rutin -both containing this structure- act as more effective antioxidants than apigenin, a very similar molecule. Comparing the antioxidant activity in the copper-induced LDL oxidation of the luteolin and luteolin-7-*O*-glucoside, the antioxidant capacity of both structures was similar. Despite the described preventive effects of those flavonoids in the diminution of the lag-phase of LDL induced by Cu<sup>++</sup> and other oxidants [37,38] no data were available on their role as inhibitors of protein oxidation markers. In fact, luteolin can be classified as an agent with more potential for preventing direct oxidation (i.e. GSA and AASA accumulation) than for preventing lipid peroxidation, as it shows a lower power for protecting against Cu<sup>++</sup>-induced lipidome changes in LDL, in agreement with recent data showing a modest inhibition in the formation of thiobarbituric acid-reactive substances driven by Cu<sup>++</sup> [39]. In contrast with this relative low *in vitro* potential, it shows a high efficiency in both cell systems as it is able to completely block tert-BOOH-induced changes in cell viability and it shows a high potential against oxLDL-induced cell death, in agreement with the reported inhibitory effect of luteolin in oxidized LDL-induced endothelial monocyte adhesion and/or oxidised LDL uptake[39].

Other major phenols quantified in virgin olive oils are lignans, with a 2,3-dibenzylbutane skeleton, whose concentration is related with the olive cultivar of origin [11]. Although they are important as sources of lignans metabolite enterodiol and enterolactone by colonic flora metabolism, our data reveal that acetoxypinoresinol and pinoresinol possess antioxidant activity, in agreement with previous reports, where it was shown that some vegetable extracts, rich in pinoresinol, were able to inhibit LDL oxidation [40,41]. Their antioxidant activity could be more closely related to their chelating properties than scavenging activity, as they only exhibit a hydroxyl group linked to an aromatic ring. Globally, acetoxypinoresinol and pinoresinol exhibit similar potencies in the inhibition of direct protein oxidation and lipid peroxidative damage, as well as in the prevention of lipidome changes induced by Cu<sup>++</sup>.

With regard to the phenolic acids group (ferulic, cumaric, caffeic and gallic acids) (**Figure 1**), all the phenols showed antioxidant capacity at 50 and 100 µM. Ferulic and *p*-cumaric acids showed a slight prooxidant activity at 5 µM, that may be attributed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* production from phenolic compounds [42,43]. According to how they act, the phenolic acids may be classified as free radical terminators interfering with lipid oxidation by rapid donation of a hydrogen atom to peroxy radicals. Their antioxidant activity is related to the molecule containing at least two neighboring phenolic hydroxyl groups; three such groups are even more desirable facilitating the interference. Results of the present study showed that the caffeic (with two neighboring phenolic hydroxyl groups) and gallic acids (three hydroxyl groups) to have the highest

antioxidant capacity. Previous results have demonstrated the antioxidant capability of gallic and caffeic acids on lipid peroxidation [44-46], but only one reported the effect of gallic acids on protein modification, and that was related to nitrosative stress [47]. Concerning their cellular effects, gallic and caffeic acid differed in their effects: while gallic acid was unable to prevent oxLDL-induced or tBOOH-induced loss of viability, caffeic acid inhibited the toxic effects of oxLDL. This agrees with the known effect of gallic acid as a proapoptotic agent [48-50] and the reported protective effect of caffeic acid in endothelial cell survival after oxLDL treatment [51]. All the phenols studied showed antioxidant capacity in the LDL model, the OH-tyrosol being the most effective. In general, all the phenols showed higher antioxidant activity than  $\alpha$ -tocopherol, which could be attributed to the hydrophilic nature of the phenolic structures. In the biphasic microenvironment constituting core lipids and water phase, such as biomembranes and plasma lipoproteins, the location of phenols should be taken into account for understanding their antioxidant activity. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) seems to be located within the membrane lipids or lipoprotein particles because of its high lipophilicity. However, it is demonstrated that flavonoid aglycones interact in the polar surface region of the phospholipids bilayers in membranes [52], offering a higher protection. In summary, these data show novel antioxidant properties of olive-derived polyphenols in LDL oxidation. It is also demonstrated that *in vitro* antioxidant measurements could only partially predict biologic responses to oxidized LDL, thus reinforcing the importance of a multidisciplinary approach for the description of oxidative phenomena in atherosclerosis pathogenesis and its dietary modulation.

## REFERENCES

- [1] Goldstein JL, Brown MS: *The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis*. Annual Review of Biochemistry. **1977**, 46: 897-930.
- [2] Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS: *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1979**, 76: 333-337.
- [3] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. : The New England Journal of Medicine. **1989**, 320: 915-924.
- [4] Hazell LJ, Arnold L, Flowers D, Waeg G, *et al.*: *Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions*. The Journal of Clinical Investigation. **1996**, 97: 1535-1544.
- [5] Hazen SL, Heinecke JW: *3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima*. The Journal of Clinical Investigation. **1997**, 99: 2075-2081.
- [6] Leeuwenburgh C, Hardy MM, Hazen SL, Wagner P, *et al.*: *Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima*. The Journal of Biological Chemistry. **1997**, 272: 1433-1436.
- [7] Berliner JA, Heinecke JW: *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. Free Radical Biology and Medicine. **1996**, 20: 707-727.
- [8] Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G: *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radical Biology and Medicine. **1992**, 13: 341-390.
- [9] Hazell LJ, Stocker R: *Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages*. Biochemical Journal. **1993**, 290 ( Pt 1): 165-172.
- [10] Ness AR, Powles JW: *Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review*. International Journal of Epidemiology. **1997**, 26: 1-13.
- [11] Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ, *et al.*: *Phenolic compounds in Spanish olive oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1999**, 47: 3535-3540.
- [12] Abbey M, Nestel PJ, Baghurst PA: *Antioxidant vitamins and low-density-lipoprotein oxidation*. American Journal of Clinical Nutrition. **1993**, 58: 525-532.
- [13] Jialal I, Grundy SM: *Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation*. Circulation. **1993**, 88: 2780-2786.



- [14] Suarna C, Hood RL, Dean RT, Stocker R: *Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins*. Biochimica et Biophysica Acta. **1993**, 1166: 163-170.
- [15] Hou L, Zhou B, Yang L, Liu ZL: *Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides*. Chemistry and Physics of Lipids. **2004**, 129: 209-219.
- [16] Chen CY, Milbury PE, Chung SK, Blumberg J: *Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B-100 oxidation and conformation*. The Journal of Nutritional Biochemistry **2007**, 18: 785-794.
- [17] Oorni K, Pentikainen MO, Annala A, Kovanen PT: *Oxidation of low density lipoprotein particles decreases their ability to bind to human aortic proteoglycans. Dependence on oxidative modification of the lysine residues*. The Journal of Biological Chemistry. **1997**, 272: 21303-21311.
- [18] Wagner P, Heinecke JW: *Copper ions promote peroxidation of low density lipoprotein lipid by binding to histidine residues of apolipoprotein B100, but they are reduced at other sites on LDL*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. **1997**, 17: 3338-3346.
- [19] Yan LJ, Lodge JK, Traber MG, Packer L: *Apolipoprotein B carbonyl formation is enhanced by lipid peroxidation during copper-mediated oxidation of human low-density lipoproteins*. Archives of Biochemistry and Biophysics. **1997**, 339: 165-171.
- [20] Artajo LS, Romero MP, Morello JR, Motilva MJ: *Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54: 6079-6088.
- [21] Pamplona R, Dalfo E, Ayala V, Bellmunt MJ, et al.: *Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets*. The Journal of Biological Chemistry. **2005**, 280: 21522-21530.
- [22] Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, Siuzdak G: **Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism**. Clinical Chemistry. **2007**, 53: 2169-2176.
- [23] Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, et al.: *Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo*. The Journal of Biological Chemistry. **1997**, 272: 13597-13607.
- [24] Goya L, Mateos R, Bravo L: *Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide*. European Journal of Nutrition . **2007**, 46: 70-78.
- [25] Goya L, Delgado-Andrade C, Rufian-Henares JA, Bravo L, et al.: *Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide*. Molecular Nutrition & Food Research . **2007**, 51: 536-545.

- [26] Berlett BS, Stadtman ER: *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. The Journal of Biological Chemistry. **1997**,272: 20313-20316.
- [27] Vissers MN, Zock PL, Katan MB: *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review*. European Journal of Clinical Nutrition. **2004**, 58: 955-965.
- [28] Leenen R, Roodenburg AJ, Vissers MN, Schuurbiens JA, *et al.*: *Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2002**, 50: 1290-1297.
- [29] Covas MI : *Olive oil and the cardiovascular system*. Pharmacol Res. **2007**, 55: 175-186.
- [30] Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, *et al.*: *Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness*. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular. **2007**, 17: 535-545.
- [31] Briante R, Febbraio F, Nucci R : *Antioxidant/prooxidant effects of dietary non-flavonoid phenols on the Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation of human low-density lipoprotein (LDL)*. Chemistry and Biodiversity . **2004**, 1: 1716-1729.
- [32] Mazziotti A, Mazzotti F, Pantusa M, Sportelli L, *et al.*: *Pro-oxidant activity of oleuropein determined in vitro by electron spin resonance spin-trapping methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54: 7444-7449.
- [33] Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, *et al.*: *Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells*. BioMed Central Cancer . **2007**, 7: 80- 92.
- [34] Hamdi HK, Castellon R: *Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **2005**, 334: 769-778.
- [35] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radical Biology & Medicine. **1996**, 20: 933-956.
- [36] Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: *Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies*. Methods in Enzymology. **1990**, 186: 343-355.
- [37] Kostyuk VA, Kraemer T, Sies H, Schewe T: *Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids*. Federation of European Biochemical Societies Letters. **2003**, 537: 146-150.
- [38] Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA: *Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties*. Biochemical Journal. **1998**, 330: (Pt 3) 1173-1178.

- [39] Jeong YJ, Choi YJ, Choi JS, Kwon HM, *et al.*: *Attenuation of monocyte adhesion and oxidised LDL uptake in luteolin-treated human endothelial cells exposed to oxidised LDL*. British Journal of Nutrition. **2007**, 97: 447-457.
- [40] Chen CC, Chen HY, Shiao MS, Lin YL, *et al.*: *Inhibition of low density lipoprotein oxidation by tetrahydrofuran lignans from Forsythia suspensa and Magnolia coco*. Plantas Medicinales. **1999**, 65: 709-711.
- [41] Vuorela S, Kreander K, Karonen M, Nieminen R, *et al.*: *Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53: 5922-5931.
- [42] Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, *et al.*: *Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells*. Cancer Research. **2005**, 65: 8049-8056.
- [43] Long LH, Clement MV, Halliwell B: **Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media**. Biochemical and Biophysical Research Communications. **2000**, 273: 50-53.
- [44] Hsieh CL, Yen GC, Chen HY: *Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53: 6151-6155.
- [45] Hseu YC, Chang WH, Chen CS, Liao JW, *et al.*: *Antioxidant activities of Toona Sinensis leaves extracts using different antioxidant models*. Food and Chemical Toxicology. **2008**, 46: 105-114.
- [46] Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM: *Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation*. Biochemical Pharmacology. **1994**, 48: 487-494.
- [47] Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S: *Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **1997**, 232: 164-168.
- [48] Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva MC, de Souza CA, *et al.* : *Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. **2008**, 16: 3791-3799.
- [49] Hsu CL, Lo WH, Yen GC: *Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2007**, 55: 7359-7365.
- [50] Agarwal C, Tyagi A, Agarwal R: *Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells*. Molecular Cancer Therapeutics. **2006**, 5: 3294-3302.

[51] Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, *et al.*: *Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL*. British Journal of Pharmacology. **1998**, 123: 565-573.

[52] Fukuzawa K, Matsuura K, Tokumura A, Suzuki A, *et al.*: *Kinetics and dynamics of singlet oxygen scavenging by alpha-tocopherol in phospholipid model membranes*. Free Radical Biology & Medicine. **1997**, 22: 923-930.



## **9. CAPÍTULO III: RESULTADOS** **Biodisponibilidad de los compuestos** **fenólicos del aceite de oliva**

### **9.1 ESTUDIOS “IN VITRO”: EFECTOS DE LA DIGESTIÓN** **SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA**

### **9.2 ESTUDIO “EX VIVO”: METABOLISMO Y TRANSPORTE DE** **LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA A TRAVÉS** **DEL MODELO CELULAR CACO 2-TC7**

### **9.3 ESTUDIOS “IN VIVO”: CARACTERIZACIÓN DE LA** **BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL** **ACEITE DE OLIVA EN HUMANOS**



**ESTUDIOS “IN VITRO”: EFECTOS DE LA DIGESTIÓN SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA****ESTUDIO “EX VIVO”: METABOLISMO Y TRANSPORTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA A TRAVÉS DEL MODELO CELULAR CACO 2-TC7****ABSTRACT**

The aims of this study were to investigate (i) the metabolism of olive oil phenolics by intestinal epithelial cells and (ii) their transport across epithelial cell monolayers. The various conjugates and derivatives produced by the intestinal epithelial cells were identified following separation by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) using a combination of UV/visible spectra, mass spectrometry and specific enzyme treatments ( $\beta$ -glucuronidase and aryl-sulfatase). Limited metabolism of olive oil phenolics was observed using Caco 2/Tc7 cells as a model of the human intestinal epithelium, and the methylated conjugates were the major metabolites detected. The results of the transport rate data for phenols and their metabolites to the apical, cellular, and basolateral compartments after apical loading of the phenol at 100  $\mu$ M showed a time dependent efflux of various free and conjugated forms of phenols.

## INTRODUCTION

The beneficial effects of a Mediterranean diet on human health are widely known and it is commonly considered that the presence of a variety of antioxidant-rich foods in such diets is at least partly responsible. Virgin olive oil represents the principal fat component of the Mediterranean diet and it is a source of at least 30 phenolic compounds. The most important phenolic compounds that have been identified in olive oil are phenolic alcohols (such as hydroxytyrosol and tyrosol), secoiridoid derivatives (such as the dialdehydic form of elenolic acid linked to tyrosol (*p*-HPEA-EDA), the aldehydic form of elenolic acid linked to tyrosol (*p*-HPEA-EA), the dialdehydic form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA), 4-(acetoxylethyl)-1,2-dihydroxybenzene (3,4-DHPEA-AC), oleuropein aglycone (3,4-DHPEA-EA) and its methylated form (methyl 3,4-DHPEA-EA)), phenolic acids and derivatives (such as vanillic acid and vanillin respectively), lignans (pinosresinol and acetoxypinosresinol) and flavonoids (including luteolin and apigenin) [1].

Phenolic compounds are of fundamental importance in virgin olive oil for their nutritional properties, sensory characteristics, and the shelf life of the product [2, 3]. In particular, the phenolic compounds are potent antioxidants, and can confer a marked bitter taste or a sweet taste typical of some virgin olive oil [4, 5]. In addition, they are thought to play an important role in human diets as preventative agents against several diseases [6, 7].

In experimental studies, olive oil phenolics have been shown to: 1) be powerful antioxidants, more potent than vitamin E in preventing lipids and DNA oxidation [8, 9]; 2) prevent endothelial dysfunction by decreasing the expression of cell adhesion molecules [10], increasing nitric oxide (NO) production by increasing endothelial NO synthase activity [11] and quenching vascular endothelium intracellular free radicals [12]; 3) inhibit platelet-induced aggregation [13]; and 4) enhance transcription of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GSH-Px) [9]. Recently, an ibuprofen-like activity has been described for oleocanthal or *p*-HPEA-EDA, a lignostroside aglycone present in olive oil [14]. Other potential activities of olive oil phenolic compounds include chemopreventive activity [7].

Nevertheless, to achieve any effect in a specific tissue or organ, these bioactive compounds must be bioavailable, which refers to the compound's tendency to be extracted from the food matrix, and they must then be absorbed from the gut via the intestinal cells. Experimental results from *in vitro* cellular systems have shown that hydroxytyrosol is quantitatively transported into the small intestinal epithelial cells by passive diffusion [15]. Data from *in vivo* experiments with animals and humans have confirmed that olive oil phenolics are well absorbed at the intestinal level [16]. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed by humans in a dose-dependent manner (i.e. the olive oils with the highest concentration of phenolics deliver the highest concentrations of hydroxytyrosol to blood) [17]. Even from moderate doses (25 mL/d), which are lower than the traditional daily dietary intake in Mediterranean countries [18], it has been shown that around 98% of these phenolics are present in plasma and urine in conjugated forms, mainly glucurono-conjugates. These observations indicate that the first-pass intestinal / hepatic metabolism of the ingested phenolics is extensive [19].



However, data regarding the metabolism of olive oil phenolics in the human body are very limited, and contrasting results have been obtained regarding the amounts and forms in which they are present in plasma and excreted in urine [20]. A first step would be trying to know the fate of olive oil phenolic compounds during the digestion, metabolism and absorption processes, how rapidly they are released from the food matrix under the physiological conditions occurring *in vivo*, and the stability of these compounds under these conditions.

The studies of bioavailability of phytochemicals carried out in animals or human subjects are complex, expensive and lengthy. In this sense, *in vitro* digestion models permit the characterization of phenolics during digestion under physiological conditions, caused by alimentary enzymes, and to obtain information going beyond that gained by the chemical analysis of food. Furthermore, the *in vitro* digestion models allow the screening of multiple samples and may provide data on the relative bioavailability of different polyphenolic components. In combination with a cultured cell model that facilitates studies of small-intestinal absorption and metabolism, it is possible to determine the relationship between the molecular structures, gastrointestinal stability, conjugation and extent of absorption for virgin olive oil phenols as an important step towards elucidating the potential impact of these compounds on human health.

The first objective of the present study was to evaluate the digestive stability of phenols from virgin olive oil, using an *in vitro* gastrointestinal digestion method simulating gastric and small-intestinal phases. The second part of the study was focused on investigating (i) the metabolism of olive oil phenolics by intestinal epithelial cells and (ii) their transport across epithelial cell monolayers using a Caco2/TC7 cell culture model. For the second objective, the most representative components of the phenolic fraction of virgin olive oil that were transferred to the aqueous fraction during the simulated digestion were selected for investigation.

## MATERIALS AND METHODS

### *Phenol Standards*

Hydroxytyrosol, tyrosol, *p*-coumaric acid, and luteolin were purchased from Extrasynthese (Genay, France). (+)-Pinoresinol was acquired from Arbo Nova (Turku, Finland).

### *In vitro digestion model*

Triplicate samples of virgin olive oil were digested. The procedure was adapted from the method outlined by Gil-Izquierdo et al., 2002 [21] slightly modified. The method consists of two sequential steps; an initial pepsin/HCl digestion for 2h at 37° C, to simulate gastric conditions, followed by a digestion with bile salts/pancreatin for 2h at 37°C to simulate duodenal digestion. For the pepsin/HCl digestion, a sample of olive oil (15g) was mixed with pepsin (14800 U) in 20 mL of water acidified with HCl to reach pH=2 and was then incubated in a 37° C orbital shaking (250 rpm) (Infors AG CH-4103, Bottmingen, Switzerland) for 2 h. After gastric digestion, the pancreatic digestion was simulated. The pH was increased

to 6.5 with  $\text{NaHCO}_3$  (0.5N) and then 5 mL (1:1; v/v) of pancreatin (8 mg/mL) – bile salt (50 mg/mL) were added and incubated in a 37° C orbital shaking (250 rpm) for 2h.

After each step of digestion, lipid (oil digesta) and water (aqueous micellar) phases were separated by ultracentrifugation at 30000g for 20 min at 4 °C. The phenols present in both phases from the pepsin-HCl and pancreatin-bile digestions were extracted and analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, as described by Suarez et al., 2008 [22].

### *Maintenance of the Caco2/TC7 cell line*

The manipulation of the cell line was carried out in an Envair Class II model safety cabinet with laminar flow. Aseptic techniques were used to ensure the sterility of cells and growing medium, so all glassware was sterilised in an autoclave, consumables were packaged and sterilised or pre-sterilised also in the autoclave and water was purified using a Millipore filtration unit (Millipore Corporation, Billerica, MA) and was subsequently sterilised in an autoclave. Both the media and the solutions were pre-warmed in the bathroom at 37 °C before they established contact with the cells.

The Caco2/TC7 cells were used between passages 51 and 61 in the metabolism experiments and between 49 and 51 for transport experiments. Cells were grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks, maintained in DMEM+ at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air, and new flasks were seeded at a concentration of  $2\text{-}4 \times 10^4$  cells / cm<sup>2</sup>.

### *Metabolism Experiments*

#### *Olive oil phenols cellular metabolism experiments.*

Caco-2/TC7 cells were seeded at  $2\text{-}4 \times 10^4$  cells / cm<sup>2</sup> on six-well plates. All metabolic experiments were carried out in triplicate, such that two six-well plates were required per compound. Three of the 12 wells were not seeded with cells for use as a control that would contain only medium and phenolic compound. The medium was changed every 2nd day, and the cells were allowed to grow and differentiate up to 7 days after reaching confluence. At this point the media was aspirated and cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Phenols dissolved in methanol (final methanol concentration in the medium= 0.04%) were added to the media of treatment cells at a final concentration of 40, 50 and 100 μM, and to control cells a solution of the same volume and concentration of HPLC-grade methanol was added. Control and treated cells were incubated at 37 C, for 1, 6 or 24 h. The medium also contained ascorbic acid (100 μM) as a protective antioxidant. After incubation, the culture medium was split into two aliquots of 1 mL in Eppendorf vials and methanol (25 μL) and glacial acetic acid (25 μL) were added. The cells were washed three times with PBS and then harvested by scraping after addition of water (400 μL), methanol (25 μL) and glacial acetic acid (50 μL). For all samples, galangin (50 μM final concentration) was added as an internal standard. All samples were kept frozen at -20 °C until phenolic analysis.

On the day of the phenolic analysis, medium and cell samples were thawed if necessary, mixed on a bench-top vortex mixer, and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm at 4 °C in a bench-top micro-centrifuge and the supernatant removed and placed in an HPLC vial for

analysis. Cell samples were sonicated for 10 min at room temperature to break down the cell membrane before centrifugation.

The results of the metabolism experiments were expressed as total nmols in culture media or cells after the incubation. Additionally, the metabolism yield is expressed as the percentage of the molar amount transformed for each phenol in relation to the initial concentration in the culture media (40  $\mu\text{M}$ = 80 nmol; 100  $\mu\text{M}$ = 200 nmol; 50  $\mu\text{M}$ = 100 nmol).

#### *Enzymatic hydrolysis of potential metabolites.*

A fraction of the medium from cell incubations was subjected to an enzymatic hydrolysis prior to HPLC analysis. For that purpose, media samples (1 ml) were treated with 23 mg (150 U) of  $\beta$ -glucuronidase, or with 10 mg (150 U) of aryl-sulphatase (Sigma-Aldrich, Poole, UK) or with both enzymes simultaneously. The hydrolysis solutions were shaken for a minute to disperse the enzymes and incubated at 37 °C for 2 h prior to preparation for phenol analysis as indicated above.

#### *Transport Experiments*

##### *Evaluation of monolayer integrity in transwells.*

(i) Measuring the trans-epithelial electrical resistance (TEER): The TEER of the transwells was routinely measured directly before the change of culture medium. A Millicell-ERS volt ohmmeter (Millipore corporation), was used to take the measurements as per the supplied instructions. The TEER was expressed in  $\Omega \text{ cm}^2$  after subtracting the reading of the resistance of the supporting filter (well without monolayer of cells) and multiplying it by the area of the monolayer (1.1  $\text{cm}^2$ ). The monolayer was considered to be sufficiently integrated the TEER was greater than 180  $\Omega \text{ cm}^2$ .

(ii) Phenol red transport: The culture medium was removed from apical and basolateral compartments and both areas were washed three times with PBS. After this, 0.6 mL of DMEM+ medium containing phenol red was added to the apical compartment, while the basolateral compartment was loaded with 1.5 mL DMEM+ without phenol red. Cells were incubated at 37 °C for 60 min and then the diffusion of phenol red across the monolayer from the apical compartment to the lower basolateral was determined by measuring absorbance at 479 nm. Wells that supported <0.1% of phenol red transport under these conditions were considered suitable for use.

##### *Determination of trans-epithelial transport.*

First, the medium was aspirated from both apical and basolateral compartments and the cells were washed three times with PBS.

For 9 of the 12 wells, medium (0.6 mL) containing 100  $\mu\text{M}$  ascorbic acid was added to the apical compartment and the phenolic added at the appropriate concentration. To the other three wells, medium containing ascorbic acid and methanol (vehicle) was added to serve as a control. The basolateral compartment of all 12 wells was filled with 1.5 mL of DMEM

containing 100  $\mu\text{M}$  ascorbic acid. Plates were incubated at 37 °C, for 1, 6 and 24 h (three wells per time period). Following incubation, apical medium (0.6 mL), basolateral medium (1.5 mL) and cells (collected by adding 400  $\mu\text{L}$  of water and scraping the monolayer after washing the cells three times with PBS) were placed in clean Eppendorf tubes. Methanol (25, 50 and 25  $\mu\text{L}$ ) and glacial acetic acid (25, 50 and 50  $\mu\text{L}$ ) were added to the apical medium, basolateral medium and cell samples, respectively. Galangin (final concentration 50  $\mu\text{M}$ ) was added to all samples as an internal standard and samples were frozen until analysis. Prior to analysis the samples were thawed, mixed on a bench-top vortex mixer, and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm at 4°C. Before centrifugation, suspension cells were sonicated for 10 min at room temperature to break down the cell membrane and the supernatant was analysed. The results of transport experiments were expressed as relative transport rate in the apical, cellular and basolateral compartments.

### *Phenolic analysis by UPLC-MS*

The analyses were performed by UPLC-PDA-MS as described by Suarez et al., 2008 [22]. Ionization was achieved using electrospray (ESI) interface operating in the negative mode  $[\text{M-H}]^-$ . Mass spectra in the full-scan mode were collected by scanning between  $m/z$  80 and 800, and the most abundant ions for each phenolic compound were monitored by selected-ion monitoring (SIM) acquisition. The ionization source parameters were similar to described by Suarez et al., 2008 [22].

### *Phenolic metabolites characterization and quantification*

Due to the absence of pure standards, the phenolic metabolites produced were quantified on the basis of the response factors for the corresponding parent compounds. The mass spectrometer was managed in the full-scan and the SIM modes simultaneously. In order to characterise and identify their structures, full-scan mode at different cone voltages (from 20 to 60 V) was used. First, a low cone voltage was applied to determine the pseudomolecular ion  $[\text{M-H}]^-$ . Then, in order to obtain further structural information, high cone voltages were applied and specific fragment ions were generated. As we wanted to detect the phenolic metabolites at low concentrations, the SIM mode was used for the quantification because in the scan mode there was no response at these levels of concentration.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### *Phenol digestion stability*

The impact of both gastric and small-intestinal phases of digestion on olive oil phenols was examined. The extent of digestion was evaluated by quantifying the phenolics in both the lipid (oil digesta) and water (aqueous micellar) phases, calculated back to a 1 g sample of the virgin olive oil test food (**Table 9.1-2 1**). All the major olive oil phenolics (tyrosol, hydroxytyrosol and the related secoiridoid structures (3,4-DHPEA-EDA and *p*-HPEA-EDA) and elenolic acid) showed good stability in the gastric digestion model. Although the profile of phenolics was similar in the oil digesta and aqueous micellar phases, the relative distribution between the phases was different for each of the phenolic compounds. The

amphiphilic characteristics of the secoiridoids permit their partition between the oily phase and the water phase, and they tended to be more concentrated in the aqueous phase because of their polar functional groups. On the other hand, the more hydrophobic flavonoids (apigenin and luteolin) were mainly present in the oily phase after the gastric digestion.

**Table 9.1-2 1.** Relative amounts of phenols in test oil, digesta and aqueous micellar fraction after *in vitro* digestion of virgin olive oil (VOO). The results are expressed as total nmols of phenol in each phase per gram of virgin olive oil digested.

Phenol	Test oil (nmols/g VOO)	Gastric digestion		Duodenal digestion	
		Oil Digesta (nmols)	Aqueous Micellar (nmols)	Oil Digesta (nmols)	Aqueous Micellar (nmols)
Hydroxytyrosol	19.9	2.88	32.8	0.64	26.1
Tyrosol	15.3	3.68	27.9	4.16	48.6
<i>p</i> -coumaric acid	0.85	0.44	0.25	0.00	0.00
Elenolic acid	207	59.3	194	0.61	2.43
3,4-DHPEA-EDA	384	22.2	236	0.00	1.72
<i>p</i> -HPEA-EDA	39.4	9.85	21.7	0.00	0.00
Pinoresinol	4.62	12.1	0.00	9.64	0.00
(+)-1-Acetoxypinoresinol	28.9	17.8	22.8	26.9	24.08
Apigenin	3.59	3.50	0.00	1.21	0.00
Luteolin	11.5	10.0	0.36	0.60	3.67

The resistance to these phenol structures to the acid conditions of the stomach may be related with the conditions they have encountered during the oil extraction process. Indeed, the major forms of phenolics in the olive fruits are glycosides, and the aglycones (oleuropein, ligstroside, flavonoids and lignans) that are the predominant forms of phenolics in the olive oil are formed as a consequence of the acidic conditions and the presence of  $\beta$ -glucosidase activity when the olives are pasted during olive oil production [1]. Moreover, the resistance of olive oil phenolics to acidic gastric conditions may explain the increase in concentration of plasma tyrosol, hydroxytyrosol, and 3-*O*-methyl-hydroxytyrosol at 60 minutes after the intake of the olive oil with high phenolic content [23].

In contrast, the stability of these dietary phenols when exposed to small-intestinal conditions (incubation at pH 6.5 with pancreatin and bile salts at 37 °C for 2 h) was very low (Table 9.1-2

1). In fact, of the main phenols of virgin olive oil, only 10% of the secoridoids 3,4-DHPEA-EDA and *p*-HPEA-EDA, were recovered in the aqueous phase. The flavonoids were also unstable, but these phenolics were mainly recovered from the oil digesta fraction. In contrast, lignans were quite stable to gastrointestinal and duodenal digestion conditions.

In addition to determining their stability under gastric and duodenal digestion conditions, the potential bioavailability of some olive oil phenolics transferred to the aqueous phase after the duodenal digestion was determined. It is known that the rate at which phenolics are taken up by enterocytes from aqueous environments (the first step in absorption) is dependent on their concentration in solution. Therefore, the concentration of phenolic in solution is an important factor in determining bioavailability because the phenolics can be considered bioavailable. However, it is necessary to remember that the digested aqueous phase almost certainly contains micelles and therefore will include phenolic components that are not truly in solution, but associated with these hydrophobic-centred micelles. It is not currently known whether micelle-borne phenolics are more or less bioavailable for intestinal uptake.

Having determined the extent to which olive oil phenolics are released to the aqueous phase during gastro-duodenal digestion, it was next necessary to measure the relative rates of uptake and trans-epithelial transport of the phenolics by intestinal epithelial cells.

#### *Detection and identification of phenol metabolites by differentiated CaCo-2/TC7 Cells*

The intestinal metabolism of the major virgin olive oil phenols quantified in the aqueous duodenal phase (**Table 9.1-2 1**) (tyrosol, hydroxytyrosol, and luteolin) was studied following application at different concentrations (40  $\mu$ M, 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M) for different incubation periods (1, 6 and 24 hours), using differentiated Caco 2/TC7 cell monolayers as a model of the human intestinal epithelium. As consequence of the lack of commercial standards, *p*-coumaric acid and pinoresinol were used instead elenolic acid and acetoxypinoresinol, respectively. The human colon adenocarcinoma cell line TC7 corresponds to a spontaneously differentiating clone derived from the original Caco2 cell population [24]. The main advantage of this cellular line is related with its stability when grown as monolayers on Transwell inserts in relation to the parental CaCo-2 parent cell line.

Cells were grown on dishes, and the metabolites were determined in the medium and in the cell. After the incubation, the resulting putative metabolites of the phenols produced by the intestinal epithelial cells were detected and identified following separation by UPLC using a combination of UV/visible spectra and mass spectrometry. Additionally confirmation of the conjugation was obtained by treatment of the medium samples with specific enzymes,  $\beta$ -glucuronidase and aryl-sulphatase, resulting in the disappearance of the respective conjugates.

The native forms were identified by comparing the ESI-MS spectra of media / cell samples in full-scan mode and their retention time with those of pure standards. The various metabolites formed after incubation of the phenolic compounds with the cells were identified using ESI-MS spectra with additional information provided by specific enzymatic hydrolyses, i.e. with  $\beta$ -glucuronidase and aryl-sulphatase. **Table 9.1-2 2** shows chromatographic and mass

characteristics of hydroxytyrosol, tyrosol, *p*-coumaric acid, pinoresinol and luteolin and their metabolites, and the reaction to the  $\beta$ -glucuronidase and aryl-sulfatase treatments. **Figures 9.1-2 1 - 9.1-2 5** show the extracted ion chromatograms and the ESI-MS spectra of the native forms and the respective metabolites of hydroxytyrosol, tyrosol, *p*-coumaric acid, pinoresinol and luteolin, respectively.

#### ***Hydroxytyrosol (Figure 9.1-2 1).***

Hydroxytyrosol was identified on the basis that the putative peak gave rise to the pseudomolecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z$  153 and the ion fragments at  $m/z$  135 and 123. These fragment ions are due to the loss of a water molecule and the  $CH_2OH$  group, respectively. The ESI-MS spectrum of the compound eluted at 7.11 min showed an intense ion at  $m/z$  233, which formed two major fragment ions, one at  $m/z$  153 and the other at  $m/z$  123. These ions could be related to the loss of the sulphate molecule and the hydroxytyrosol rupture, respectively, and this evidence allowed putative identification of the metabolite as hydroxytyrosol sulphate (M1). At retention times of 8.36 and 9.50 min, another hydroxytyrosol metabolite was observed by examination of the ESI-MS spectra and it was characterized by an intense ion at  $m/z$  247. The presence of the two peaks could be attributed to structural isomers. This metabolite presents a fragment ion at  $m/z$  233 which can be explained by the loss of the methyl group, and a fragment at  $m/z$  167 which can be described by the loss of the sulfate molecule. Therefore, this metabolite could be identified as hydroxytyrosol methyl-sulphate (M2). The metabolite hydroxytyrosol methyl (M3), gave the pseudomolecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z$  167 and the fragment ion at  $m/z$  153, due to the loss of the methyl group.

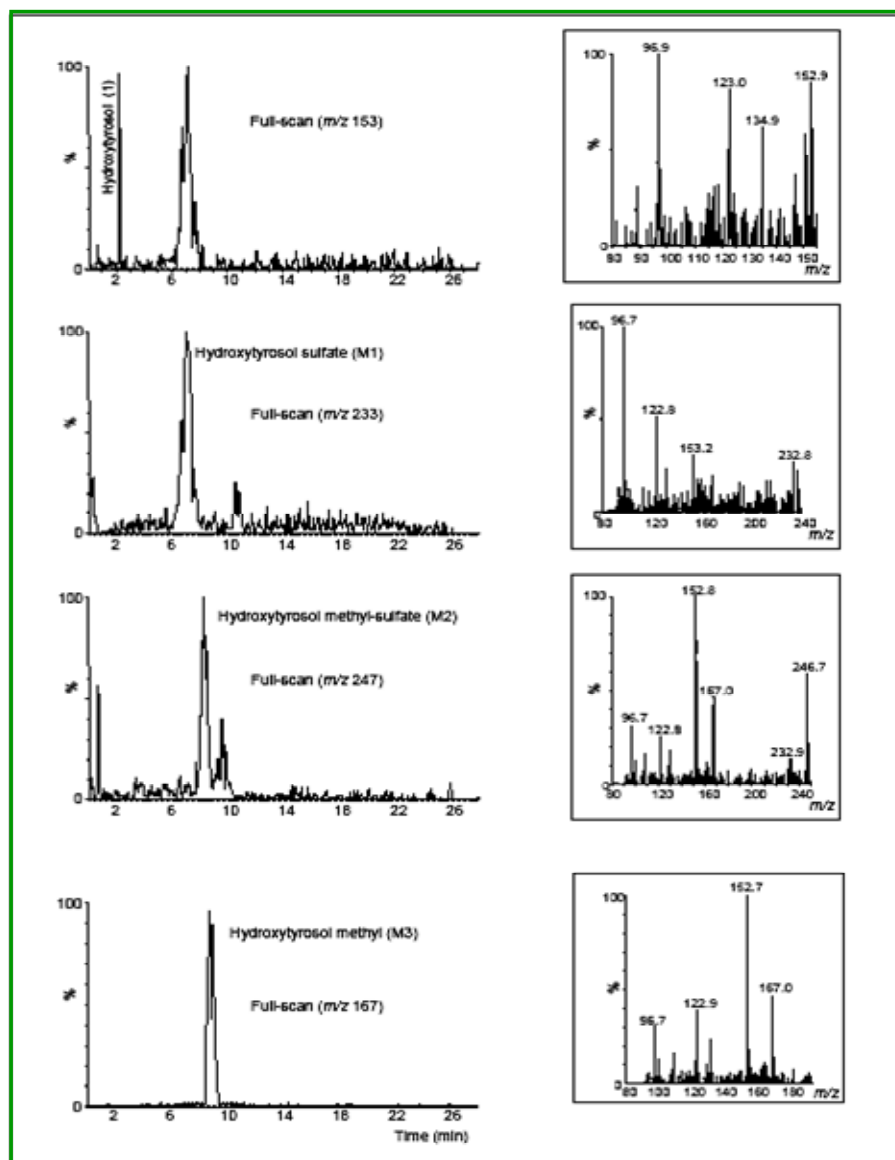


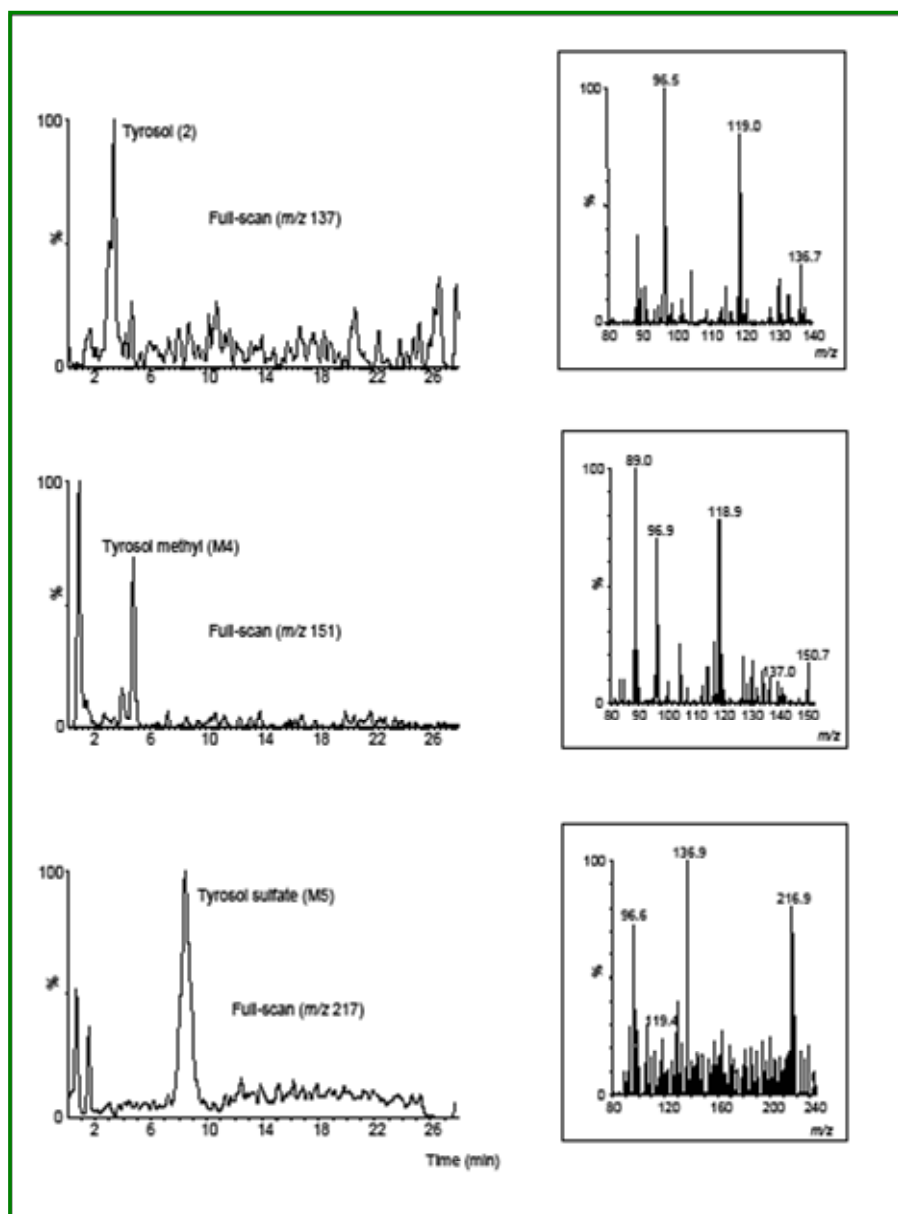
Figure 1

**Figure 9.1-2 1.** Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectra of the native form of hydroxytyrosol and the generated metabolites: hydroxytyrosol-sulfate (M1), hydroxytyrosol-methyl-sulfate (M2) and hydroxytyrosol-methyl (M3).



**Tyrosol (Figure 9.1-2 2).**

The spectrum generated for this compound gave the pseudomolecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z$  137 and a ion fragment at  $m/z$  119. M4 and M5 are tyrosol metabolites indicated by the production of fragment ions at  $m/z$  137, which demonstrates the existence of the tyrosol molecule. The first metabolite (M4) gave the pseudomolecular  $[M-H]^-$  at  $m/z$  151 and the second one (M5) at  $m/z$  217, which can be explained by the loss of the methyl group and the sulphate molecule, respectively.



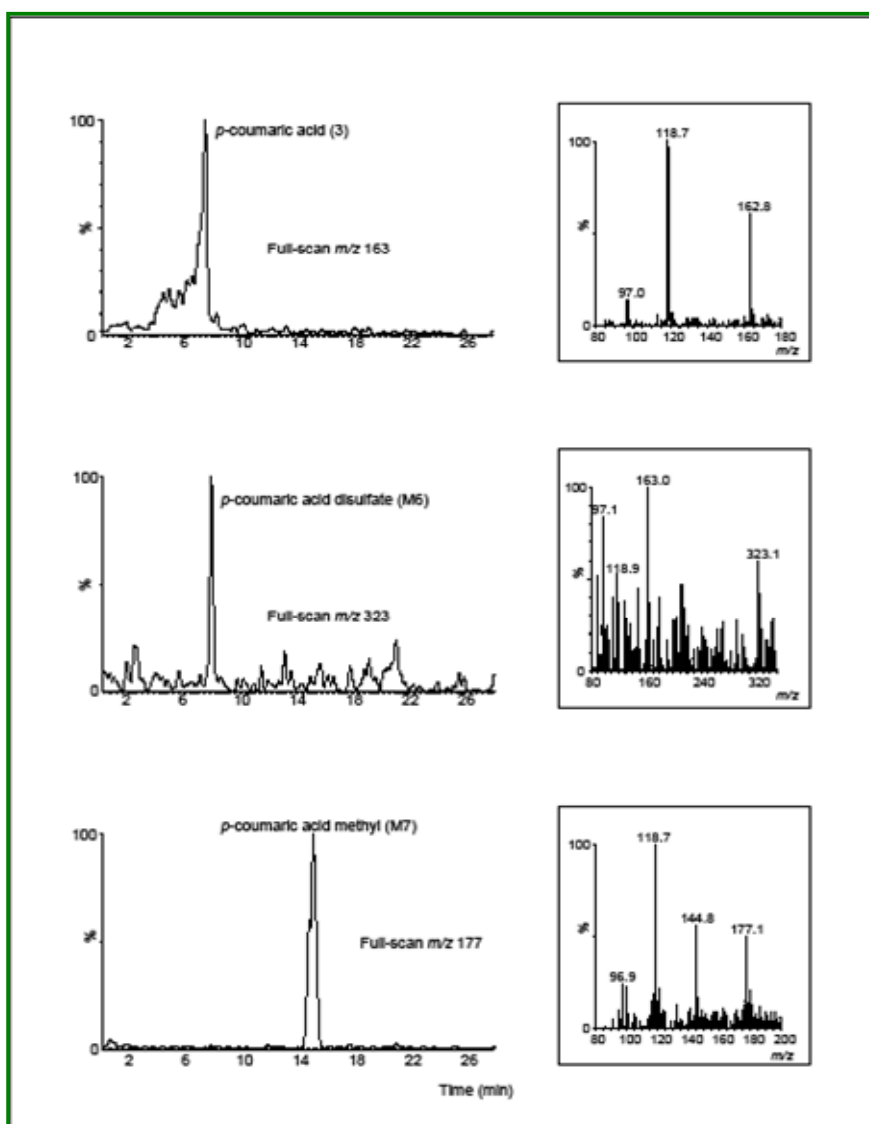
**Figure 9.1-2 2.** Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectrums of the native form of tyrosol and the generated metabolites: tyrosol-methyl (M4) and tyrosol-sulphate (M5).

**Table 9.1-2.2.** Chromatographic and mass characteristics of hydroxytyrosol (1), tyrosol (2), p-coumaric acid (3), pinoresinol (4) and luteolin (5) and the metabolites (M) formed after incubation using differentiated Caco-2/Tc7 cells monolayer as a model of the human intestinal epithelium.

Peak	MW <sup>a</sup>	RT <sup>b</sup> (min)	Comparison to standard	[M-H] <sup>-</sup>	Fragment ions	Reaction to (G) or (S) <sup>c</sup>	Proposed compound
1	154	2.24	Available	153	123	-	Hydroxytyrosol
M1	234	7.11	Not available	233	153, 123	S	Hydroxytyrosol sulfate
M2	248	8.36, 9.50	Not available	247	233, 167, 153, 123	S	Hydroxytyrosol methyl-sulfate
M3	168	8.96	Not available	167	153, 123	-	Hydroxytyrosol methyl
2	138	3.34	Available	137	119	-	Tyrosol
M4	152	4.80	Not available	151	137, 119	-	Tyrosol methyl
M5	218	8.40	Not available	217	137, 119	S	Tyrosol sulfate
3	164	7.40	Available	163	119	-	Coumaric acid
M6	324	7.80	Not available	323	163, 119	S	Coumaric acid disulfate
M7	178	15.06	Not available	177	145, 119	-	Coumaric acid methyl
4	358	16.34	Available	357	212, 151, 117		Pinoresinol
M8	438	13.09	Not available	437	357, 151	S	Pinoresinol sulfate
M9	534	14.00	Not available	533	357, 151	G	Pinoresinol glucuronide
5	286	15.01	Available	285	212, 119	-	Luteolin
M10	462	13.5	Not available	461	285	G	Luteolin glucuronide
M11	300	16.65	Not available	299	285	-	Luteolin methyl
M12	476	17.60	Not available	475	461, 299, 285	G	Luteolin methyl-glucuronide

*p*-coumaric acid (Figure 9.1-2 3).

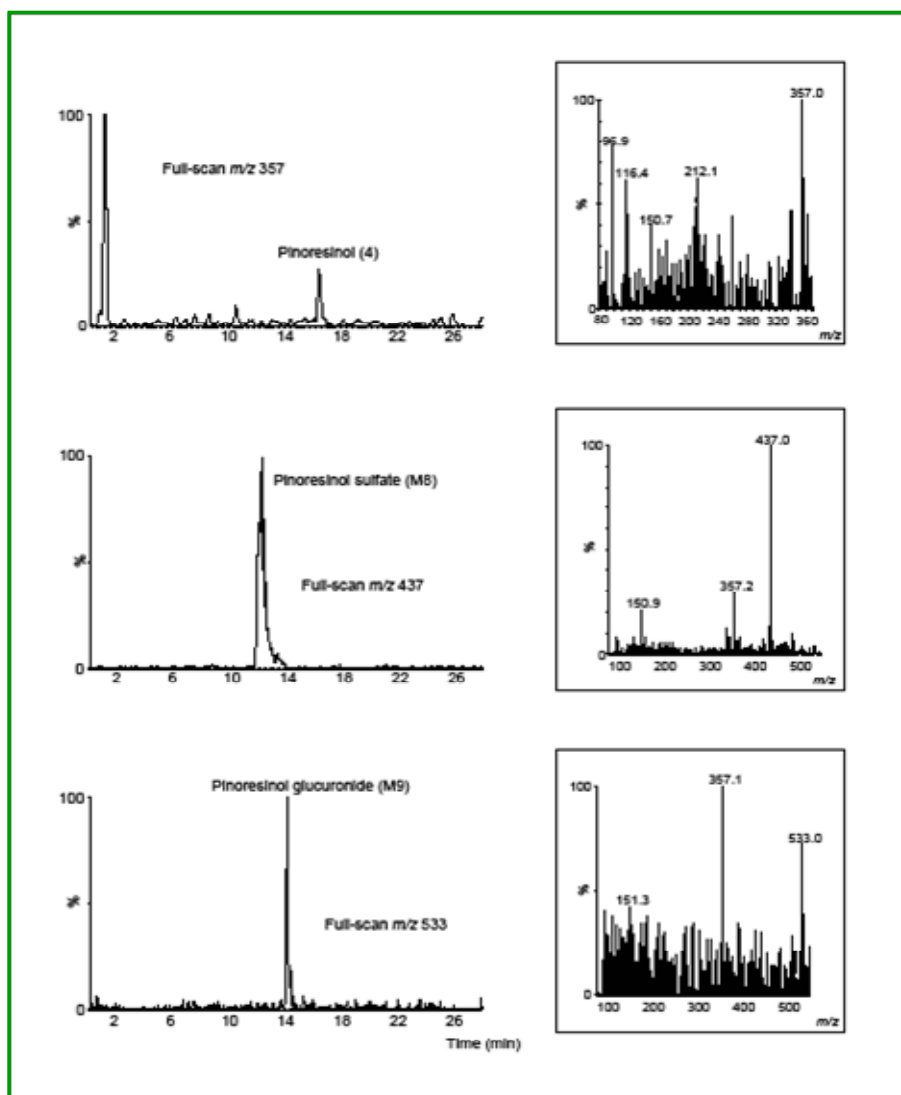
The spectrum generated for this compound gave the pseudomolecular  $[M-H]^-$  at  $m/z$  163. The fragment ion at  $m/z$  119 is due to the loss of the carboxylic group ( $CO_2$ ). M6 and M7 are coumaric acid metabolites by the fact that their fragment ion spectra include ions at  $m/z$  163, which demonstrates the existence of the coumaric acid molecule and the additional fragment ion at  $m/z$  119. The fragment  $m/z$  145 is consistent with the loss of a water molecule. M6 was putatively identified as coumaric acid disulphate (evidence for the loss of two sulphate molecules). M7 was putatively identified as *p*-coumaric acid methyl (loss of methyl group on fragmentation).



**Figure 9.1-2 3.** Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectra of the native form of *p*-coumaric acid and the generated metabolites: *p*-coumaric acid-disulfate (M6) and *p*-coumaric acid-methyl (M7).

*Pinoresinol* (Figure 9.1-2 4).

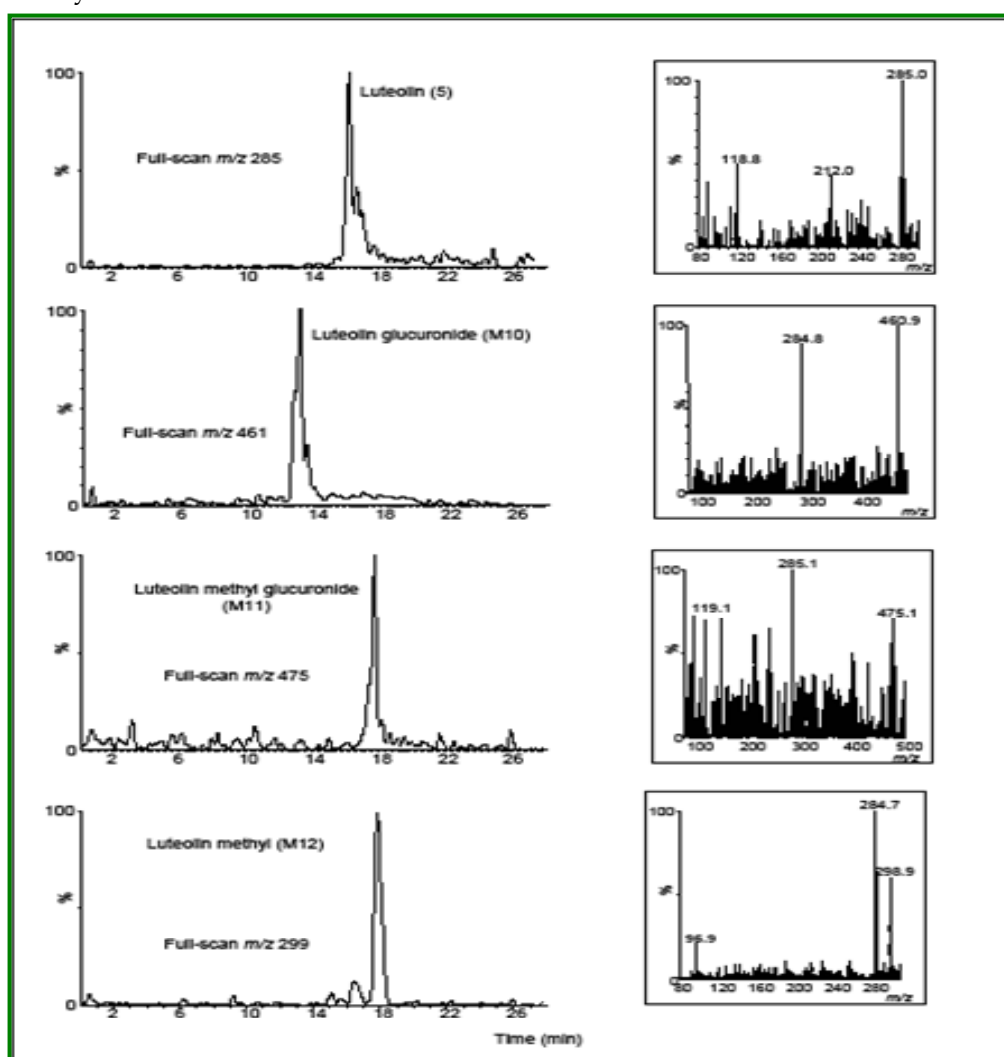
The spectrum generated for this compound gave the pseudomolecular molecule  $[M-H]^-$  at  $m/z$  357. M8 and M9 are pinoresinol metabolites on the basis that their fragments produce ions at  $m/z$  357, which demonstrates the existence of the pinoresinol molecule. The first one (M8) gave the pseudomolecular  $[M-H]^-$  at  $m/z$  437 and the second one (M9) at  $m/z$  533, which can be explained by the loss of the sulphate and the glucuronide molecule, respectively.



**Figure 9.1-2 4.** Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectra of the native form of pinoresinol and the generated metabolites: pinoresinol-sulfate (M8) and pinoresinol-glucuronide (M9).

**Luteolin (Figure 9.1-2 5).**

The spectrum generated for this compound gave the pseudomolecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z$  285. As can be seen in **Table 9.1-2 2**, four metabolites could be identified (M10, M11, M12 and M13) by the fact that their fragment ions produce ions at  $m/z$  285, which demonstrates the existence of the luteolin molecule. M10 and M11 could be identified as luteolin monoglucuronides ( $[M-H]^- = 461 m/z$ ) and luteolin methyl ( $[M-H]^- = 299 m/z$ ) due to the loss of glucuronide molecule and the methyl group, respectively. M12 showed fragment ions at  $m/z$  461 and 299 and M12 was tentatively identified as luteolin methyl-monoglucuronide ( $[M-H]^- = 475 m/z$ ). The last luteolin metabolite identified could be luteolin dimethyl ( $[M-H]^- = 313 m/z$ ) the fragment ions of which were  $m/z$  299 and  $m/z$  285. These could be explained by the loss of a single methyl group and two methyl groups, respectively.



**Figure 9.1-2 5.** Extracted ion chromatogram and the ESI-MS spectra of the native form of luteolin and the generated metabolites: luteolin-glucuronide (M10), luteolin-methyl (M11) and luteolin-methyl-glucuronide (M12).

The phenolic compounds and their metabolites were quantified (or tentatively quantified with respect to metabolites) in the SIM mode, because it has the advantage of increasing sensitivity in addition to reduce noise from interfering compounds.

### *Quantification of Metabolites and Metabolism Yield*

As a consequence of the low conjugate production observed after 1 h of incubation, it was decided to increase the initial concentration of the different phenols from 40  $\mu\text{M}$  to 100  $\mu\text{M}$  taking account of the different incubation times. Epithelial cell metabolism of phenolic compounds was monitored at 1-, 6- and 24- h incubation times, analyzing the products formed as a consequence of cell metabolism in the extracellular culture medium as well as in cytoplasmatic contents after cell lysis (**Table 9.1-2 3**). The metabolites present in the medium could have been produced intracellularly and excreted to the apical side of the monolayer or produced directly in the medium by secreted enzymes. The concentrations of the phenols after the incubation in the Caco-2/TC7 cell monolayer were expressed as nmols present in the total volume of culture medium or cells. Additionally, the metabolism yield was expressed as the percentage of transformed phenol in relation to its initial concentration in the cellular medium

A previous study by Manna et al., 2000 [15] focusing on molecular transport, using differentiated Caco-2 cell monolayers demonstrated that hydroxytyrosol transport occurred via a passive bidirectional diffusion mechanism. The only hydroxytyrosol metabolite, with a 10% conversion, detectable in the culture medium was 3-hydroxy-4-methoxyphenylethanol, the product of catechol-*O*-methyltransferase activity. In keeping with these earlier findings, in the present study the highest metabolism yield corresponded with the formation of methyl hydroxytyrosol, ranging from 10.7 to 18.6% dependent on the incubation period. In addition, small quantities of sulphated and methyl-sulphated conjugates of hydroxytyrosol were also formed after the 6 and 24 h of incubation. The major metabolism of hydroxytyrosol observed in our study could be related with a better conjugation efficacy of the Caco-2/TC7 compared with the parental CaCo-2 cell line that was used in the previous study by Mamma et al., 2000 [15]. Incubation of Caco-2/TC7 cells with tyrosol resulted in slow conjugation; the methyl and sulphate conjugates were only quantifiable after 24 h of incubation showing similar metabolism yields as with hydroxytyrosol. Similarly *p*-coumaric acid conjugate production was observed only when the initial concentration of the substrate was 100  $\mu\text{M}$ , indicating a slow rate of conjugate production. At initial substrate concentrations of 40 and 50  $\mu\text{M}$ , no conjugation was observed, regardless of the period of incubation. This slow conjugation of olive oil phenolics by CaCo2/TC7 cells is in contrast to the previously reported rapid and efficient conjugation of flavonoids such as flavonols in this model system [25].

**Table 9.1-2 3.** Amounts of various phenols and their metabolites (expressed as nmols/2 ml culture media) in cell culture media and cells after the incubation at different concentrations in the culture media (40  $\mu\text{M}$ = 80 nmols; 100  $\mu\text{M}$ = 200 nmols; 50  $\mu\text{M}$ = 100 nmols) and incubation periods, using differentiated Caco2/Tc7 cell monolayers as a model of the human small intestinal epithelium. The metabolism yield is expressed as percentage of the nmols transformed of each phenol.

Phenols and metabolites	Amount in cell culture media (nmols)			Amount in cells (nmols)		
	40 $\mu\text{M}^a$ , 1 h	100 $\mu\text{M}^b$ , 6 h	50 $\mu\text{M}^c$ , 24 h	40 $\mu\text{M}^a$ , 1 h	100 $\mu\text{M}^b$ , 6 h	50 $\mu\text{M}^c$ , 24 h
<b>Hydroxytyrosol</b>	18.1	126	30.1	7.28	n.d.	n.d.
<sup>o</sup>	8.58 (10.7%)	28.8 (14.4%)	18.6 (18.6%)	n.d.	29.8 (14.9%)	n.d.
<b>Hydroxytyrosol sulfate</b>	n.d.	6.01 (3.05%)	7.16 (7.16%)	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Hydroxytyrosol methyl-sulfate</b>	n.d.	9.32 (4.66%)	6.18 (6.18%)	n.d.	n.d.	n.d.
Total metabolism Hydroxytyrosol	<b>10.7%</b>	<b>22.1%</b>	<b>31.9%</b>	<b>0%</b>	<b>14.9%</b>	<b>0%</b>
<b>Tyrosol</b>	67.2	94.9	26.8	8.07	29.9	<b>9.41</b>
<b>Tyrosol methyl</b>	n.d.	n.d.	10.8 (10.8%)	n.d.	n.d.	<b>13.7 (13.7%)</b>
<b>Tyrosol sulfate</b>	n.d.	n.d.	9.78 (9.78%)	n.d.	n.d.	n.d.
Total metabolism Tyrosol	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>20.6%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>13.7%</b>
<b>p-coumaric acid</b>	70.4	213	112	1.65	15.6	<b>9.09</b>
<b>p-coumaric acid disulfate</b>	n.d.	3.04 (1.52%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>p-coumaric acid methyl</b>	n.d.	4.44 (2.22%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total metabolism p-coumaric acid	<b>0%</b>	<b>3.74%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
<b>Pinoresinol</b>	74.32	167	31.7	1.80	15.2	<b>12.3</b>
<b>Pinoresinol sulfate</b>	2.28 (3.06%)	44.3 (22.2%)	20.5 (20.5%)	n.d.	5.48 (2.74%)	<b>3.67 (3.67%)</b>
<b>Pinoresinol glucuronide</b>	n.d.	12.18 (6.09%)	10.04 (10.0%)	n.d.	9.37 (4.69%)	<b>14.9 (14.9%)</b>
Total metabolism Pinoresinol	<b>3.06%</b>	<b>28.3%</b>	<b>30.5%</b>	<b>0%</b>	<b>7.43%</b>	<b>18.6%</b>
<b>Luteolin</b>	34.1	31.2	9.54	n.d.	6.10	<b>8.38</b>
<b>Luteolin glucuronide</b>	n.d.	8.96 (4.48%)	8.64 (8.64%)	n.d.	6.37(3.19%)	<b>6.83 (6.83%)</b>
<b>Luteolin methyl-glucuronide</b>	n.d.	8.54 (4.27%)	10.2 (10.2%)	n.d.	15.5 (7.74%)	<b>7.31 (7.31%)</b>
<b>Luteolin methyl</b>	14.6 (18.3%)	21.6 (10.7%)	11.1 (11.1%)	0.65	7.03 (3.52%)	<b>8.01 (8.01%)</b>
Total metabolism Luteolin	<b>18.3%</b>	<b>19.5%</b>	<b>29.9%</b>	<b>0.65%</b>	<b>14.5%</b>	<b>22.2%</b>

While the absorption and metabolism of hydroxytyrosol, phenolic acids and flavonoids have been quite extensively studied, the metabolism of lignans has not been reported in any detail. When Caco-2/TC7 monolayers were incubated with pinosresinol over 24 h, the highest concentrations of conjugates were observed at 100  $\mu$ M (6h) and 50  $\mu$ M (24 h) (Table 9.1-2 3). A major metabolite, the sulphate derivative, was observed at highest concentrations after 6 and 24 h of incubation. Pinosresinol glucuronide was also detected, but its contribution to total conjugate levels was low (approximately 6-10 %). Metabolism of the luteolin was more rapid than the rest of the phenols considered in this study, and resulted mainly in the formation of the methyl conjugate, independent of the incubation time. However, we could only detect the conjugation of luteolin to form glucuronide and methyl-glucuronide conjugates after the longest incubation times, the concentration of which remained stable in the medium up to 24 h.

### *Transport of Phenols in the CaCo-2/TC7 Model of the Small Intestine*

The mechanism of absorption of virgin olive oil phenols is unclear despite the numerous studies reported over the last few years. The different polarity of oleuropein and ligstroside aglycones, tyrosol, hydroxytyrosol, flavonoids and lignans probably results in different mechanisms of absorption [26]. Some studies suggested that the oleuropein and ligstroside aglycones (hydroxytyrosol and tyrosol esterified with elenolic acid) may be hydrolyzed in the gastrointestinal tract [18, 26], after which the transport of the resulting polar phenols, tyrosol and hydroxytyrosol, might occur via passive diffusion [15]. Other postprandial studies provided evidence that the olive oil phenolic compounds undergo extremely extensive first-pass intestinal/hepatic metabolism in the body, and glucuronide, sulfate and methyl conjugates of hydroxytyrosol and tyrosol are the predominant forms in plasma and urine [27, 28]. Both these reports concluded that the phenolic compounds of virgin olive oil could modulate the oxidative/antioxidative balance in human plasma, in an oxidative stress situation (e.g. the postprandial oxidative stress promoted by lipid-rich diets), with oral doses of olive oil greater than 25 mL. The fact that phenolic compounds from virgin olive oil are bioavailable in humans, even at low doses (22 grams per day), supports their potential for a protective role [19].

However, there is little research focussing on the transport of individual phenol conjugates. Results of the metabolism experiments in the present study showed that all of the phenols were conjugated to different degrees in the CaCo-2/TC7 cell culture model of the small intestine. In order to fully understand the absorption of phenols, it is important to understand how conjugation affects the efflux of phenol conjugates from inside the enterocytes. Therefore, the efflux of hydroxytyrosol, tyrosol, *p*-coumaric acid, pinosresinol and luteolin conjugates from clonal CaCo-2/TC7 cells was investigated, with specific reference to the presence of the native forms and their metabolites in the apical, cellular and basolateral compartments after different incubation periods.

The transport rate data for phenols and their metabolites to the apical, cellular, and basolateral compartments after apical loading of the phenol at 100  $\mu$ M is shown in Table 9.1-2 4. In general apical loading of individual phenols resulted in time-dependent efflux of different conjugates. After 1 h of incubation, the native forms of tyrosol and *p*-coumaric acid, pinosresinol and luteolin were detected in the basolateral compartment as



well as in the apical and cellular compartments. Similarly a basolaterally favoured efflux was observed for the conjugates of pinoreosin, probably as a consequence of the efficient metabolism of these phenols in the CaCo-2/TC7 model. When the incubation time was increased to 6 hours, hydroxytyrosol and pinoreosin and their conjugated forms also showed significant basolateral transport. All the phenols included in the study and their metabolites showed preferential apical to basolateral transport after 24 hours of incubation.

## CONCLUSION

Limited metabolism of olive oil phenolics was observed using Caco 2/Tc7 cells as a model of the human intestinal epithelium. Although all the phase II enzymes required (methyltransferase, sulpho-transferase and uridine diphosphate glucuronosyltransferase) have been shown to be present in CaCo-2 cells, in this study the methylated conjugates were the major metabolites detected. Since it has been reported that sulphate and glucuronide conjugates are found in plasma and urine of human subjects fed olive oil phenolics, it is likely that these are products of hepatic metabolism. Also, we have shown that there was extensive transport of the parent aglycones and their conjugates to the basolateral side.

**Table 9.1-2 4.** Transport profile of individual phenol metabolites in CaCo-2/TC7 cell monolayers after different incubation periods (1, 6 and 24 hours). A '-' indicates not detected while the number of '+' indicates the relative transport rate (+, relatively slow; ++, relatively fast) for phenols and their metabolites in the apical, cellular and basolateral compartments after apical loading of the phenol at 100 µM.

Phenols and metabolites	1 hour			6 hours			24 hours		
	Apical	Cellular	Basolateral	Apical	Cellular	Basolateral	Apical	Cellular	Basolateral
Hydroxytyrosol	++	-	-	++	-	++	+	+	-
Hydroxytyrosol methyl	-	-	-	+	+	+	-	-	++
Hydroxytyrosol sulfate	-	-	-	+	-	++	-	-	++
Hydroxytyrosol methyl-sulfate	-	-	-	-	-	+	-	-	++
Tyrosol	++	+	+	+	+	++	+	-	++
Tyrosol methyl	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Tyrosol sulfate	-	-	-	+	-	-	-	-	++
Coumaric acid	++	+	+	++	+	+	++	+	++
Coumaric acid disulfate	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Coumaric acid methyl	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Pinoresinol	++	+	+	++	+	++	+	+	++
Pinoresinol sulfate	+	+	+	+	+	++	++	+	++
Pinoresinol glucuronide	+	+	+	+	+	+	-	-	++
Luteolin	++	-	+	+	-	+	+	-	+
Luteolin glucuronide	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Luteolin methyl-glucuronide	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Luteolin methyl	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## REFERENCES

- [1] Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, *et al.* : *Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade.* *Molecules.* **2007**, 12 (8): 1679-1719.
- [2] Morelló JR, Motilva MJ, Tovar MJ, Romero MP: *Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction.* *Food Chemistry.* **2004**, 85 (3), : 357-364.
- [3] Servili M, Taticchi A, Esposto S, Urbani S, *et al.* : *Influence of the decrease in oxygen during malaxation of olive paste on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2008**, 56 (21), : 10048-10055.
- [4] Artajo LS, Romero MP, Morelló JR, Motilva MJ: *Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: Evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2006**, 54 (16)???: 6079-6088.
- [5] Esti M, Contini M, Moneta E, Sinesio F: *Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage.* *Food Chemistry.* **2009**, 113 (4), : 1095-1100.
- [6] Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, *et al.* : *Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants.* *Lancet Oncology.* **2000**, 1 (2): 107-112.
- [7] Owen, R.W., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, W.E., *et al.* : *Olives and olive oil in cancer prevention.* *European Journal of Cancer Prevention.* **2004**, 13 (4), : 319-326.
- [8] Fitó M, Covas MI, Lamuela-Raventós RM, Vila J, *et al.* : *Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation.* *Lipids.* **2000**, 35 (6), : 633-638.
- [9] Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, *et al.* : *Extra Virgin Olive Oil Biophenols Inhibit Cell-Mediated Oxidation of LDL by Increasing the mRNA Transcription of Glutathione-Related Enzymes.* *Journal of Nutrition.* **2004**, 134 (4) : 785-791.
- [10] Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M: *Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals.* *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **2003**, 23 (4), : 622-629.
- [11] Moreno JJ: *Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7.* *Free Radical Biology and Medicine.* **2003**, 35 (9), : 1073-1081.
- [12] Massaro M, Basta G, Lazzerini G, Carluccio MA, *et al.*: *Quenching of intracellular ROS generation as a mechanism for oleate-induced reduction of endothelial*

- activation in early atherogenesis*. Thrombosis and Haemostasis. **2002**, 88 (2) : 335-44.
- [13] Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, *et al.* : *Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil*. Thrombosis Research. **1995**, 78 (2), : 151-160.
- [14] Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, Lin J, Pika, J, *et al.* : *Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil*. Nature. **2005**, 437 (7055)?? : 45-46.
- [15] Manna C, Galletti P, Misto G, Cucciola V, *et al.* : *Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells*. FEBS Letters. **2000**, 470 (3),: 341-344.
- [16] Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, *et al.*: *The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labelled compounds to rats*. Journal of Nutrition. **2001**, 131 (7), : 1993-1996.
- [17] Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, *et al.* : *Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans*. FEBS Letters. **2000**, 131 (7), : 159-160.
- [18] Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, *et al.* : *Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration*. Journal of Nutrition. **2003**, 133 (8), : 2612-2615.
- [19] Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schröder H, *et al.* : *Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. A randomized controlled trial*. European Journal of Nutrition. **2004**, 43 (3): 140-147.
- [20] Miró-Casas E, Covas MI, Farré M, Fitó M, *et al.* : *Hydroxytyrosol disposition in humans*. Clinical Chemistry. **2003**, 49 (6), : 945-952.
- [21] Gil-Izquierdo A, Zafrilla P, Tomás-Barberán FA: *An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract*. European Food Research and Technology. **2002**, 214 (2), : 155-159.
- [22] Suárez M, Maciá A, Romero MP, Motilva MJ: *Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil*. Journal of Chromatography A. **2008**, 1214 (1-2),: 90-99.
- [23] Ruano J, López-Miranda J, De La Torre R, Delgado-Lista J, *et al.* : *Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients*. American Journal of Clinical Nutrition. **2007**, 86 (2), : 341-346.
- [24] Chantret I, Rodolose A, Barbat A, Dussaulx E, *et al.* : *Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: Evidence for glucose-dependent negative regulation*. Journal of Cell Science. **1994**, 107 (1): 213-225.
- [25] Barrington R, Williamson G, Bennett RN, Davis BD, *et al.* : *Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/TC7 cell model*. Journal of Functional Foods. **2009**, 1: 74-97.

- [26] Vissers MN, Zock PL, Katan MB: *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil in humans: A review*. European Journal of Clinical Nutrition. 2004, 58 (8), : 955-965.
- [27] Covas MI, Ruiz-Gutiérrez V, De La Torre R, Kafatos A, et al.: *Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans*. Nutrition Reviews. 2006, 64 (10 SUPPL. 1),: S20-S30.
- [28] De la Torre-Carbot K, Chávez-Servín JL, Jaúregui O, Castellote AI: *Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta. 2007, 583 (2) : 402-410.



## ESTUDIOS “IN VIVO”: CARACTERIZACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA EN HUMANOS

### ABSTRACT

The effect of repeated consumption of virgin olive oil on endogenous phenolic metabolites of fasting plasma is unknown. For this reason, we hypothesized that regular long-term virgin olive oil intake could have an indirect protection effect on the endogenous phenols. Thus, the aim of the study was to determine the phenolic profile of human plasma in a fasting state of long-term regular virgin olive oil consumers, using the fasting plasma of non-consumers as a natural control. Forty participants living in the area of Reus (Catalonia, Spain) were selected, 20 life-long regular consumers of virgin olive oil and a natural control of 20 non-consumers, the latter being Rumanians who dislike the taste of olive oil, leading to non-intake. The diet was obtained from three-day food records. The results showed similar phenolic composition of fasting plasmas of the two volunteer groups. Of special interest is that more of the compounds quantified showed higher concentration in fasting plasma from habitual virgin olive oil consumers. Fasting consumer's plasma showed higher concentration of a flavonoid-type compound ( $2.90 \pm 0.04 \mu\text{mol/l}$  vs  $1.5 \pm 0.04 \mu\text{mol/l}$ ) and a catecholamine derivative ( $0.70 \pm 0.03 \mu\text{mol/l}$  vs  $0.56 \pm 0.03 \mu\text{mol/l}$ ) than the plasma of non-consumers ( $P < 0.05$ ). The results suggest an indirect protective mechanism of long-term regular virgin olive oil consumption related to the protection of the endogenous antioxidant system.

## INTRODUCTION

Epidemiologic studies have clearly shown that the habitual consumption of olive oil, as a principle fat source in the diet, is associated with a low incidence of coronary heart disease, certain types of cancers and a modulation of immune and inflammatory responses. It seems that this protection is due to diverse combinations of biological effects including antioxidant [1], anti-inflammatory [2, 3] vasodilatation [4] and anti-platelet aggregation properties [2], as well as the modulation of gene expression [5,6]. For years, the healthy properties of virgin olive oil (VOO) were exclusively attributed to its high monounsaturated fatty acid (MUFA) content, mostly in the form of oleic acid (18:1n-9). The recent results of the EUROLIVE study have provided evidence of the antioxidant in-vivo role of phenolic compounds from VOO in humans [7]. The most important effects observed were related to the increase in high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels and the decrease in lipid oxidation damage, after high phenolic oil consumption.

The chemical composition of VOO is divided into major components, which include glycerols, representing more than 98% of total oil weight, and minor components. These components, which are present in very low amounts (about 2% of oil weight), include more than 230 chemical compounds, such as aliphatic and triterpenic alcohols, sterols, hydrocarbons, volatile compounds and antioxidants (carotenoids, and lipophilic and hydrophilic phenolic compounds) [8]. Some of these minor components of olive oil, mainly the hydrophilic phenols, are removed during the refining process. As a consequence, these compounds are specific to VOO.

The most abundant phenols in VOO are the secoiridoid derivatives formed during olive oil extraction by enzymatic removal of glucose from the polar parent compounds oleuropein and ligstroside, glycoside phenolic structures from the olive fruit. The final products are the polar compounds hydroxytyrosol and tyrosol respectively [9], that are in minor concentration in VOO. However, after VOO consumption, these compounds are extensively metabolized which are subsequently absorbed into the systemic circulation and detected in plasma in their conjugated forms. As a consequence, some of these polyphenol metabolites have been used as VOO consumption markers in the most recent interventional studies [10, 11], that have demonstrated the dose-dependent absorption of olive oil phenolics in humans and their urinary excretion as glucuronide conjugates.

However, the effect of repeated consumption of VOO on endogenous phenolic metabolites of fasting plasma is unknown. For this reason, we hypothesized that regular long-term VOO intake could have an indirect protection effect on the endogenous phenols. Thus, the aim of the study was to determine the phenolic profile of human plasma in a fasting state of long-term regular VOO consumers, using the fasting plasma of non-consumers as a natural control.



## MATERIALS AND METHODS

### *Subjects*

Forty healthy participants, 20 (10 women and 10 men) were regular long-term VOO consumers and 20 (10 women and 10 men) were non-consumers, the latter being Rumanian people, who never ingested any types of olive oil, because they disliked its taste. The criteria for the group of consumers were long-term consumption of VOO (more than 23 g/day over a period of 10 years), and for the group of non-consumers, the total absence of VOO in the diet during the previous 10 years. The criteria for exclusion, derived from medical history and a complete physical examination, were diabetes mellitus, congestive heart failure, renal or hepatic insufficiency, thyroid or other endocrine disease, blood pressure >140/90 mmHg and the current use of drugs or vitamins.

The human study design was approved by the Ethical Committee of Clinical Research at Sant Joan University Hospital, Reus, Spain (Reference 08-04-24/4 proj5). The study protocol was fully explained to the patients and they gave their written consent on enrolment.

### *Preparation of the plasma samples*

Human plasma samples were obtained by venipuncture from the forty healthy volunteers. Blood samples (50 ml) were collected after a 12 h overnight fasting period. The samples were stored in Vacutainer™ tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant. They were protected from the light with aluminium foil, and centrifuged for 15 min. at 1500 g and at 4° C (Kokusan, H-103RS, Japan), and the plasma was immediately separated from the cells and kept at -80° C until analysis.

### *Laboratory measurements*

Total plasma cholesterol, very low density lipoprotein (VLDL) and total triacylglycerol concentrations were measured with enzymatic kits (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). HDL cholesterol was measured by a direct method (Immuno AG, Vienna, Austria) and low density lipoprotein (LDL) cholesterol determined by the Friedewald algorithm [LDL-cholesterol = total cholesterol - (triacylglycerols/2.2 + HDL-cholesterol)] [12]. Inter-assay coefficients of variation ranged from 2.5-3.0% for total plasma cholesterol, 2.4-3.1% for HDL-cholesterol, and 2.6-4.8% for total plasma triacylglycerols.

### *Solid-Phase-Extraction (SPE) of phenols in human plasma*

The phenolic extracts of fasting human plasma were obtained by a solid-phase extraction procedure using the method in Ruiz-Gutierrez et al. [13] with modifications. Just before extraction, a standard solution (10 µg/ml) of caffeic acid and 30 µl of phosphoric acid (85% v/v) was added to 3-ml aliquots of defrosted plasma and mixed in a vortex for 1 min. SPE of phenols from plasma samples was carried out on an Oasis HLB extraction cartridge (200 mg, 6 ml; WAT

106202) purchased from Waters (Milford, USA). Prior to use, the cartridge was conditioned with 3 ml of methanol followed by equilibration with 3 ml of water. A 3-ml aliquot of spiked acidified plasma was slowly loaded into the cartridge, followed by 1.5 ml of water Milli-Q, and then 3 ml of 5% (v/v) methanol/water. The phenolic fraction was eluted under vacuum with 6 ml of methanol and collected in a tube containing 30 µl of 1% ascorbic acid solution. The phenolic fraction was dried under a nitrogen stream. Before the high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis the residue was resolved with 200 µl of methanol and 100 µl of water/acetic acid 2%.

### *Quantification of phenols in fasting plasma samples*

The phenolic fraction obtained from the fasting plasma samples was analysed and quantified by HPLC on Waters Inc. (Milford, USA) liquid chromatography equipment with a Waters 600 E pump, Waters 717 plus auto sampler (loop 20 µl) and Waters 996 diode-array detector (DAD). The column was an Inertsil ODS-3 (5 µm, 15 cm x 4.6 mm i.d.) from GL Sciences Inc. (Tokyo, Japan) equipped with a Spherisorb S5 ODS-2 pre-column (5 µm, 1 cm x 4.6 mm i.d.) from Teknokroma (Barcelona, Spain). Empower Software 2002 from Waters Corporation (Milford, USA) was used to manage the system and to process the information. The phenolic extract was filtered through the 0.20 µm filter before injection. Water/acetic acid 2% was used as solvent A, and methanol as solvent B. Solvent A was held isocratically at 95% for 2 min, then decreased to 75% at 10 min, followed by further linear reduction to 60% at 20 min, then decreased to 50% at 30 min, and reduced to 0% at 40 min with 5 min. isocratic time, followed by strong linear ramping to 95% at 55 min and then held constant for 5 min. The chromatograms were obtained at 278 nm and 339 nm. The phenols from the fasting plasma samples were quantified by the internal standard method and the results are expressed as nmol caffeic acid/l of plasma.

### *Mass Spectral Analysis*

For the tentative identification of the phenol plasma metabolites, the mass spectral characteristics of the chromatographic peaks were obtained by mass spectroscopy with a TQD™ mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) using the electrospray ionisation (ESI) source Z-spray™. The source working conditions were as follows: capillary voltage of 3.0 KV; source temperature, 150° C; desolvation temperature, 400°C; cone gas flow rate, 80 l/h; and desolvation gas flow rate, 800 l/h. Nitrogen (99.9% purity) was used as a nebulising and desolvation gas and was provided by a high-purity nitrogen generator N<sub>2</sub>LCMS (Claind, Como, Italy), and argon (99.9999% purity, Air Liquide, Barcelona, Spain) was used as the collision gas. The MassLynx 4.1 software was used to collect and analyse the obtained data. Full-scan data were obtained by scanning from *m/z* 80 to 1200 in both negative and positive modes. In the product ion scan experiments, tandem mass spectrometry (MS/MS) product ions were produced by collision-induced fragmentation of selected precursor ions in the collision cell of the triple quadrupole mass spectrometer (MS) and their mass was analysed with the instrument's second analyser.

### *Validation procedure*

The SPE of phenols from human plasma followed by HPLC analysis was validated according to the "Food and Drug Administration" [14]. In assessing the quality of the method, we examined

the following characteristics: Reproducibility, intra-day precision and inter-day precision, linearity, accuracy, sensitivity with the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), and recovery.

For validation purposes, a homogeneous plasma matrix (without phenols) or “blank plasma” was used. It was spiked with pool of hydroxytyrosol, caffeic acid and luteolin as standards, representative compounds of simple phenols, phenolic acid family and flavonoid family, respectively, covering the expected concentration range in the plasma matrix (0.05 to 50.0  $\mu\text{mol/l}$ ). Calibration curves were constructed with six concentration points by spiking known quantities of target compounds into “blank plasma” (plasma treated with SPE). The peak areas of absorbance at 278 nm for hydroxytyrosol and caffeic acid, and 339 nm for luteolin, were plotted against the concentration for each target compound. The linearity of the data was checked by performing linear Least-squares regression analysis.

The percentage of SPE recovery of all standard compounds was determined. It was assessed at all the concentration levels of the calibration curve. Four replicates ( $n=4$ ) were done for each concentration level. The chromatographic peak areas obtained from spiked “blank plasma” samples with known concentrations were compared with the peak areas obtained from the free methanol solutions.

The reproducibility study (system precision) was performed by injecting the standards (hydroxytyrosol, caffeic acid and luteolin) in six replicates ( $n=6$ ). The reproducibility was expressed as relative standard deviation (RSD) (coefficient of variation). The inter-day precision assay was carried out by performing the overall assay, SPE and chromatographic methods. The peak areas were considered for calculating the concentration and establishing the precision that was expressed as the relative standard deviation (coefficient of variation). The measurement was repeated on a second day for the inter-day precision.

The LOD was defined as the analyte concentration that gave a signal-to-noise ratio (S/N) of 3. The LOQ referred to the lowest concentration of the analyte ( $n=5$ ) that could be determined with 20% of accuracy and precision.

### *Statistical Analysis*

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEMs. Consumer and non-consumer groups were assumed to be random samples drawn from a normally distributed population. In order to compare the concentration of possible phenols among consumers and non-consumers, an analysis of variance was performed using the General Linear Models (GLM) procedure ( $\alpha = 0.05$ ).

The variances of the two groups were equal. The factors of age, sex and olive oil consumption and their interactions were tested on the possible phenol compound concentrations. If two factors interacted, an LSMEANS analysis was carried out. TUKEY's multiple range tests were conducted to determine significant differences among treatments. The statistical analyses were performed with the Statistical Package for Social Science software package (SPSS version 15.0).

## RESULTS

### *Characteristics and dietary composition of the participants*

Recruitment for the study was carried out between September and November 2008. The characteristics, anthropometrics and lipid profile of the human plasma volunteers are shown in **Table 9.3 1**. No significant differences were observed between the two groups, except for age, which was lower in the group of non-consumers (mean  $\pm$ SEM;  $35.0 \pm 6.5$  y) than among consumers ( $45.5 \pm 9.5$  y) ( $P < 0.05$ ).

The diet composition of the participants is shown in **Table 9.3 2**. This was similar except for a higher intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the non-consumer group ( $P < 0.05$ ) and higher MUFA consumption in the virgin olive oil consumer group ( $P < 0.001$ ).

**Table 9.3 1.** Characteristics of the human volunteers' and plasma biochemical parameters after a 12 h overnight fasting period

	Consumer	Non-consumer
<b>Age (y)</b>	45.5 $\pm$ 9.5	<b>35.0 <math>\pm</math> 6.5</b>
<b>Weight (kg)</b>	76.2 $\pm$ 16.6	<b>86.0 <math>\pm</math> 16.1</b>
<b>Height (cm)</b>	164.6 $\pm$ 7.9	<b>166.8 <math>\pm</math> 5.7</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28.1 $\pm$ 5.6	<b>30.8 <math>\pm</math> 4.9</b>
<b>TCh (mmol/L)</b>	5.1 $\pm$ 1.0	<b>5.0 <math>\pm</math> 0.8</b>
<b>HDL Ch (mmol/L)</b>	1.3 $\pm$ 0.4	<b>1.3 <math>\pm</math> 0.5</b>
<b>VLDL (mmol/L)</b>	0.5 $\pm$ 0.2	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.4</b>
<b>LDL (mmol/L)</b>	3.5 $\pm$ 0.9	<b>3.2 <math>\pm</math> 0.7</b>
<b>TG (mmol/L)</b>	0.9 $\pm$ 0.5	<b>1.2 <math>\pm</math> 1.0</b>

BMI: Body mass index; TCh: Total cholesterol; HDL Ch: HDL cholesterol; VLDL cholesterol; LDL cholesterol; TG: Triacylglycerols.  
Values are the means  $\pm$  SEM, n=20

Table 9.3 2. Composition diets of the volunteers of the study.

	Consumer	Non-consumer
<b>Energy (kcal/day)</b>	2099 ± 846	<b>1547 ± 883</b>
<b>Protein (% of energy)</b>	16.4 ± 2.8	<b>17.9 ± 6.9</b>
<b>Total carbohydrates (% of energy)</b>	38.8 ± 9.4	<b>43.6 ± 5.3</b>
<b>Total fat (% of energy)</b>	41.4 ± 7.5	<b>35.1 ± 4.4</b>
<b>PUFA (% of energy)</b>	5.1 ± 1.5 <sup>2</sup>	<b>11.4 ± 4.8</b>
<b>MUFA (% of energy)</b>	20.6 ± 4.1 <sup>3</sup>	<b>10.0 ± 2.1</b>
<b>SFA (% of energy)</b>	12.4 ± 3.6	<b>10.1 ± 2.1</b>
<b>Fiber (g/day)</b>	20.8 ± 10.2	<b>15.0 ± 8.8</b>
<b>Alcohol (g/day)</b>	10.6 ± 9.3	<b>13.1 ± 9.4</b>
<b>Cholesterol (mg/day)</b>	362 ± 208	<b>222 ± 151</b>

PUFA: polyunsaturated fatty acid; MUFA: monosaturated fatty acid; SFA: saturated fatty acid. Values are the means ± SEM, n=20

### *Optimization and validation of the analytical method off-line (SPE-HPLC-DAD)*

The proposed method includes a clean-up SPE procedure using an Oasis HLB extraction system (200 mg) with good recovery efficiency and a volume of 3 ml of the plasma sample. During the optimization of the phenolic extraction procedure, three different plasma volumes were assessed, these being 1, 2 and 3 ml. In parallel, three packed cartridges, of 30, 60 and 200 mg, were evaluated. The best chromatogram was obtained when 3 ml of plasma were extracted using a 200 mg packed cartridge. The recovery experiments were conducted using phenol-free plasma spiked with hydroxytyrosol, caffeic acid and luteolin. The results showed that the recovery by SPE extraction was found to be 104 to 97% for hydroxytyrosol, 93 to 89% for caffeic acid and 75 to 70% for luteolin.

The method validation reveals good reproducibility, linearity and sensibility for the phenol standards selected by using a plasmatic matrix free of phenols. The reproducibility (system precision) was evaluated for all the calibration curve concentrations and found to be 0.01-9.3% for hydroxytyrosol, 1.1-8.5% for caffeic acid and 0.51-3.8% for luteolin. Good linearity was

achieved for all the analytes with correlation coefficients ( $R^2$ ) of 0.999, 0.993 and 0.996 for hydroxytyrosol, caffeic acid and luteolin respectively (Supporting information).

The sensitivity of the method, presented as its LOD, was found to be 2.4 nmol/ml for hydroxytyrosol, 3.0 nmol/ml for caffeic acid and 5.0 nmol/ml for luteolin. The lower detection limit for hydroxytyrosol was attributed to the fact that it exhibits significantly lower molar absorptivity than the other phenols. The LOQ was 5.0 nmol/ml for hydroxytyrosol and caffeic acid, and 8.0 nmol/ml for luteolin.

### *Phenolic compounds profile of the fasting plasma of regular VOO consumers and non-consumers*

The chromatograms of the fasting plasma samples of the two groups, regular VOO consumer and non-consumers, are presented in **Figure 1**. A total of 17 chromatographic peaks with the characteristic ultraviolet (UV) spectrum of the phenolic structures were selected for tentative identification and quantification. The compounds selected were confirmed to be the same compound in all the plasma samples from each group by HPLC-MS/MS. The comparative analysis of the chromatographic profiles of the phenolic extracts of plasma samples from the two volunteer groups showed no qualitative differences. Thus, no specific compound was detected in the plasma samples from regular consumers of VOO that could be used as a biomarker of olive oil consumption.

In order to obtain structural information about the phenolic compounds detected in the fasting plasma samples, the deprotonated molecule by negative mode  $[M-H]^-$  and by positive mode  $[M+H]^+$  in full-scan mode was firstly studied. The mass spectral characteristics of the results obtained by negative and positive modes are shown in **Tables 9.3 3 and 9.3 4**, respectively. The ESI negative in full-scan mode (**Table 9.3 3**) showed that the peaks 2, 6, 10 and 11 of the fasting plasma chromatogram (**Figure 9.3 1**) could be identified as carboxylic acids, because each of them showed the characteristic tendency of carbon dioxide loss ( $m/z$  44); and the product ion  $[M-H-CO_2]^-$  was the most intense fragment ion for these peaks. For peak 1, the product ion was  $m/z$  115 generated by the expulsion of primary and secondary alcohols  $[M-H-C_2H_5O_2]^-$  that corresponded to the loss of 60  $m/z$ , and this compound was identified as ascorbic acid. This was added to the plasma samples before phenolic extraction to improve the stability of the phenols during the extraction phase. In addition, ascorbic acid forms part of the plasma endogenous antioxidant defence system as an electron donor,  $^1O_2$  quencher or by regeneration of the  $\alpha$ -tocopheryl radical [15]. Additionally, the analysis of the spectral characteristics of peaks 4, 11 and 13 permitted their identification as tryptophan, homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid, respectively. Peak 17 could be assigned to a flavonoid structure, based on its UV spectrum with its maximum at 339 nm.

Afterwards, the ESI positive in full-scan mode (Table 4) showed the precursor ions with  $m/z$  ranging from 154 to 242. This corresponded to the peaks 3, 5, 7, 8, 12, 14, 15 and 16 of the fasting plasma chromatogram (Figure 1). After the loss of different product ions that correspond to a water molecule  $[M+H-H_2O]^+$ , to the amino  $[M+H-NH_3]^+$  and carboxylic groups  $[M+H-HCO_2H]^+$ , all the chromatographic peaks showed a common and very stable ion  $m/z$  91 that could correspond to an aromatic ring structure. By comparing the precursor and product ions with those reported in the literature, peaks 3 and 5 were identified as dopamine and tyrosine

respectively [16,17]. The identity of these compounds was also confirmed by comparing their retention times and spectral characteristics with those obtained by analysing their commercial standards.

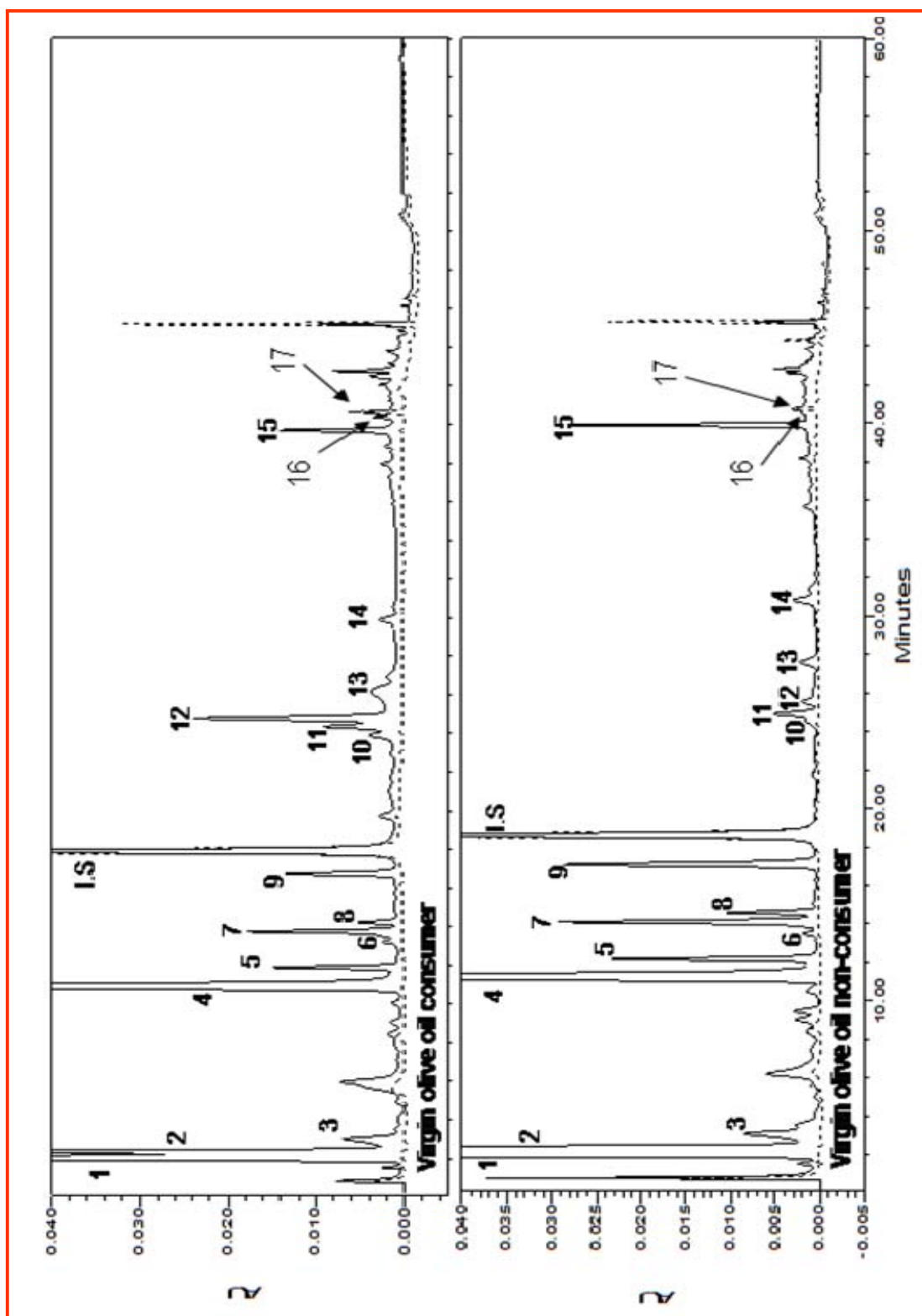


Figure 9.3 1. Chromatographic profile of phenolic metabolites in the fasting human plasma of regular VOO consumers and non-consumers.



**Table 9.3 3.** Retention time, mass spectral characteristics of chromatographic peaks of the fasting plasma phenolic extracts by UPLC-ESI-MS/MS in negative ESI (-) mode. Concentration of phenols in human plasma of consumers and non-consumers of virgin olive oil  
Values are the means  $\pm$  SEM, n=20. A star (\*) indicates that means differ significantly,  $p < 0.05$

Peak	RT (min)	Precursor ion ( $m/z$ )	Product ions ( $m/z$ )	MW	Proposed Structure	Concentration ( $\mu\text{mol caffeic acid/L plasma}$ )	
						Consumer	Non-consumer
P1	1.9	175 [M-H] <sup>-</sup>	115 [M-H-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	176	Ascorbic acid	18.5 $\pm$ 3.5	23.8 $\pm$ 5.1
P2	2.1	344 [M-H] <sup>-</sup>	300 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	345	Carboxylic acid	26.4 $\pm$ 5.0	25.4 $\pm$ 4.6
P4	10.9	203 [M-H] <sup>-</sup>	175 [M-H-28] <sup>-</sup> 116 [M-H-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	204	Tryptophan	36.6 $\pm$ 2.3	35.5 $\pm$ 2.1
P6	13.2	129 [M-H] <sup>-</sup>	85 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	130	Carboxylic acid	0.65 $\pm$ 0.17	0.50 $\pm$ 0.15
P10	23.4	255 [M-H] <sup>-</sup>	211 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	256	Carboxylic acid	0.58 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.08
P11	26.8	181 [M-H] <sup>-</sup>	137 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	182	Homovanillic acid	0.97 $\pm$ 0.23	0.45 $\pm$ 0.22
P13	29.5	255 [M-H] <sup>-</sup>	211 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> 195 [M-H-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> 167 [M-H-2CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	256	Carboxylic acid	0.71 $\pm$ 0.11	0.55 $\pm$ 0.10
P17	40.1	239 [M-H] <sup>-</sup>	195 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> 151 [M-H-2CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	240	Flavonoid	0.71 $\pm$ 0.04*	0.56 $\pm$ 0.04*

**Table 9.3 4.** Retention time, mass spectral characteristics of chromatographic peaks of the fasting plasma phenolic extracts by UPLC-ESI-MS/MS in negative ESI (+) mode. Concentration of phenols in human plasma of consumers and non-consumers of virgin olive oil  
Values are the means  $\pm$  SEM, n=20. A star (\*) indicates that means differ significantly,  $p < 0.05$

Peak	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	MW	Proposed structure	Concentration ( $\mu\text{mol}$ caffeic acid/L plasma)	
						Consumer	Non-consumer
P3	2.8	154 [M+H] <sup>+</sup>	137 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	153	Dopamine	4.9 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.8
			119 [M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>				
			91 [aromatic structure]				
P5	11.6	182 [M+H] <sup>+</sup>	165 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	181	Tyrosine	6.9 $\pm$ 1.5	5.6 $\pm$ 1.4
			136 [M+H-CO <sub>2</sub> H] <sup>+</sup>				
P7	13.8	181 [M+H] <sup>+</sup>	163 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 99 [aromatic structure]	180	Catecholamine	3.4 $\pm$ 0.7	2.7 $\pm$ 0.6
P8	14.2	181 [M+H] <sup>+</sup>	124 [M+H-57] <sup>+</sup> 99 [aromatic structure]	180	Catecholamine	1.02 $\pm$ 0.18	0.92 $\pm$ 0.16
P9	16.7	195 [M+H] <sup>+</sup>	177 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 99 [aromatic structure]	194	Catecholamine	3.3 $\pm$ 1.3	4.2 $\pm$ 1.2
P12	24.8	223 [M+H] <sup>+</sup>	177 [M+H-CO <sub>2</sub> H] <sup>+</sup>	222	Catecholamine	2.2 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.3
			159 [M+H-CO <sub>2</sub> H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>				
P14	29.9	188 [M+H] <sup>+</sup>	99 [aromatic structure] 156 [M+H-32] <sup>+</sup>	189	Catecholamine	0.81 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.11
P15	39.6	223 [M+H] <sup>+</sup>	83 [aromatic structure] 159 [M+H-74] <sup>+</sup>	225	Catecholamine	3.20 $\pm$ 0.03*	1.50 $\pm$ 0.03*
P16	40.1	242 [M+H] <sup>+</sup>	99 [aromatic structure] 130 [M+H-112] <sup>+</sup>	243	Catecholamine	0.81 $\pm$ 0.14	0.76 $\pm$ 0.13

In order to confirm whether the other compounds quantified in the fasting plasma corresponded to the catecholamines, their metabolites or their precursors, the plasma samples were spiked with commercial standards. However, it was not possible to show a complete correspondence between the molecular weight and the chromatographic and spectral characteristics of the compounds quantified in plasma and the catecholamine standards. The mass spectral characteristics showed maximum sensitivity operating in the positive ionisation mode that resulted in the protonated molecule  $[M+H]^+$  similar to catecholamines [16], and their molecular weight was between 130 and 345, similar to catecholamine structures. The molecular weight of peaks 7 and 8 is the same as caffeic acid (MW 180), and the molecular weight of peak 9 is the same as ferulic acid (MW 194). Nevertheless, the positive ionisation is typical of molecules with an amino group similarly to catecholamines. These amino structures could be formed by the reductive amination of phenol acids into catecholamines.

After analysing the spectral characteristics of each chromatographic peak and their structural elucidation, the chromatographic peaks corresponding to plasmas from VOO consumers and non-consumers were quantified (Tables 9.3 3 and 9.4 4). Inter-individual variability was found to be high in both groups. Although no qualitative differences were observed between the plasma samples of VOO consumers and non-consumers, the GLM analysis reflected that there were significant quantitative differences in two compounds, P17 (Table 3) and P15 (Table 4). Fasting consumer's plasma showed higher concentration of a flavonoid type compound (P17) ( $2.90 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$  vs  $1.5 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ ) and a catecholamine derivative (P15) ( $0.70 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$  vs  $0.56 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$ ) than the plasma of non-consumers ( $p < 0.05$ ).

Moreover, the results of the GLM procedure (Table 9.3 4) showed that the concentration of some peaks was affected by the sex factor, besides the effect of olive oil consumption. Concerning the interaction of oil consumption and sex, the concentration of some peaks (P4 and P10), corresponding to tryptophan and a carboxylic acid structure respectively, was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the fasting plasma of women.

The concentration of the compounds quantified in fasting plasmas were in the reference intervals described in the literature for plasma catecholamines, showing a wide range from 0.01 to 3.58 nmol/l [18]. Similarly, further refinements to HPLC-based procedures have also been reported using strong and weak ion-exchange resins for the preliminary isolation of catecholamines from plasma prior to their chromatographic quantification.

## DISCUSSION

Our hypothesis, that the long-term consumption of virgin olive oil phenols could increase the concentration of endogenous simple phenols, with a potential antioxidant function, in fasting plasma from healthy individuals, is confirmed. There is limited data regarding the effect of the repeat dosing of dietary phenols on the concentration of endogenous (i.e., non-dietary) simple phenols in the plasma from healthy individuals. Because of the low

physiologic concentrations of endogenous metabolites in human plasma under fasting conditions, and the potential interference from a large number of other endogenous and exogenous metabolites that are chemically, physically, and physiologically quite similar, analysing and identifying the plasma phenol metabolites is complex [17]. To minimize these interferences, before the chromatographic analysis, a solid phase clean-up of the plasma samples was applied in our study.

The comparative analysis between fasting plasmas of habitual VOO consumers and non-consumers showed a similar phenolic profile (**Figure 9.3 1**). As a general rule, the metabolites of polyphenols are rapidly eliminated from the plasma, which indicates that the consumption of plant products on a daily basis is necessary to maintain high concentrations of metabolites in the blood [19]. In general, the circulation rates of polyphenols are relatively low (maximum concentrations around 5  $\mu\text{mol/l}$ ) [20]. In the case of the phenols that present a rapid absorption, such as catechins, the accumulation of metabolites in plasma is reduced and is not obtained by continuous consumption [21]. Similarly, the pharmacokinetic study of tyrosol, hydroxytyrosol, and 3-*O*-methylhydroxytyrosol shows that the time taken to reach peak concentrations in plasma is around one hour after the ingestion of VOO with medium and high phenol content [11]. In parallel, their estimated elimination half-life is lower than 3.5 hours, so the concentration of these phenols in plasma eight or ten hours after VOO consumption is negligible. This rapid elimination of phenols could explain why no specific biomarker of long-term regular VOO consumption was detected in our study in the plasma from the consumers under fasting conditions.

The analysis of the MS characteristics showed that most of the compounds quantified in fasting plasmas showed maximum sensitivity operating in the positive ionisation mode that resulted in the protonated molecule  $[\text{M}+\text{H}]^+$  similar to catecholamines [16]. In addition, the compounds quantified in the fasting plasma corresponded to a molecular weight between 130 and 345, similar to catecholamine structures. On the other hand, the analysis of the MS characteristics showed other compounds with the maximum sensitivity operating in negative mode  $[\text{M}-\text{H}]^-$  which is typical of the phenolic structures with substitutive -OH groups that could correspond to endogenous simple phenols.

The inclusion criterion of the volunteers in our study was based on the long-term consumption of VOO, or by total absence of VOO in the diet. As a result, the dietary phenols in both groups were provided by fruits, vegetables, coffee, wine, etc. Not having detected some specific food phenols in fasting plasma samples makes us think that the structures quantified in our study could correspond to endogenous metabolites, such as catecholamines or their metabolites with a similar catecholic structures. Phenols possess a benzene ring bearing one or more hydroxyl groups, including functional derivatives [22], and catecholamines are important natural molecules containing a benzene ring with two vicinal hydroxyl groups (catechol) which act as neurotransmitters or hormones [18,23]. These monophenolic acids structured detected in the fasting plasma in both groups of volunteers in our study could be the scission products of dietetic monomeric flavonoids by the faecal microflora [24]. On the other hand, the amino catechol structures could result from the phenol acids via reductive amination.

If no qualitative differences were observed between the plasmas from the two volunteers groups, the quantification of the 17 compounds with the characteristic UV spectrum of phenolic structures revealed quantitative differences. The concentration of most of the compounds was higher in plasma from VOO consumers (**Tables 9.3 3 and 9.3 4**). As a consequence of the interindividual variation in each group of volunteers, statistically significant differences were only observed in the concentration of two compounds, a flavonoid-type compound (P16) and a catecholamine structure (P15) without interaction with other factors such as age and sex of volunteers. In addition, the more concentrated compounds, corresponding to a carboxylic acid structure (P2), tryptophan (P4) and tyrosine (P5), showed higher concentration in plasma of olive oil consumers. Both tyrosine and tryptophan are metabolic precursors to catecholamines, e.g. dopamine, and hydroxyindoleamines, e.g. serotonin, respectively, which function as essential central and peripheral neurotransmitters. The monoamine oxidase catalyzed metabolism of the former results in conversion to acetic acid derivatives, such as 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, derived from dopamine), or 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA, derived from serotonin) [25]. These acetic acid derivatives have spectral characteristics similar to those detected in the negative mode (**Table 9.3 3**) in our study, that we have identified as carboxylic acids.

Catecholamine neurotransmitters and tryptophan derivatives, including serotonin, N-acetylserotonin, 5-HIAA, and melatonin, possess free radical scavenging and neuroprotective powers [26, 27, 28]. This fact could confirm our hypothesis that the long-term consumption of VOO phenols could increase the concentration of simple endogenous phenols with a potential antioxidant function in plasma from healthy individuals. In this sense, an interesting review by Clifford and Brown [29] concluded that it is difficult to envisage how diet-derived polyphenol metabolites can make a major contribution to radical scavenging in plasma, compared with the contribution to be expected from the endogenous antioxidants in healthy individuals. Intervention studies have shown that dietary supplements were sometimes more effective, reflecting total polyphenol doses substantially above those achieved by diet alone, and frequently manifested through endpoints not directly associated with antioxidant effects. Therefore, these authors remark upon the evidence of the benefit of diets rich in fruit and vegetables related to their phenol content, indicating protective mechanisms other than direct antioxidant activity.

Therefore, our results could indicate an indirect protective effect of VOO, as the main diet lipid source, on the plasmatic endogenous phenols with a potential antioxidant functions. Catecholamines with dihydroxyphenyl and amine groups, including dopamine, norepinephrine and epinephrine, are well known for their roles as central and peripheral neurotransmitters or hormones. These three catecholamines are all derivatives of dihydroxyphenylalanine (DOPA), a catecholic amino acid which is produced from tyrosine by tyrosine hydroxylase. Catecholamines are metabolized and inactivated by two enzymes, catechol-*O*-methyltransferase (COMT) and monoamine oxidase (MAO), leading to a series of metabolites, such as 3,4-dihydroxyphenyl acetic and homovanillic acids [17]. Catechol-*O*-methyl transferase (COMT; EC 2.1.1.6) catalyzes the transfer of a methyl group from *S*-adenosyl-*L*-methionine to polyphenols having an *o*-diphenolic (catechol) moiety and plays a crucial role in the metabolism of dopamine. There is a common functional

genetic polymorphism in the COMT gene, which results in a three to fourfold difference in COMT enzyme activity in humans [30]. This enzyme methylates polyphenols and occurs in a wide range of tissues. The specificity for polyphenols will determine which hydroxyl groups on the polyphenol ring are methylated. Flavonoids, such as quercetin and fisetin, are better substrates for COMT than are its endogenous substrates, catecholamines and catechol estrogens.

This way, the habitual ingestion of dietetic phenols from VOO could mean a competitive inhibition of COMT that may explain the higher concentration of catecholamines and their metabolites in the plasma. Thus, the potential competitive inhibition of the COMT-catalyzed *O*-methylation of endogenous catecholamines and catechol estrogens by polyphenols with catechol groups may have a beneficial effect on cardiovascular pathologies. Another reason explaining the increased catecholamine derivatives in fasting plasma with regular VOO consumption observed in our study, could be related to the results of the study by Oi-Kano et al [31], who reported that the phenolic fraction of VOO enhances the noradrenaline and adrenaline secretions in plasma, which explains the enhanced triglyceride catabolism and thermogenesis. In that study, the average total amount of phenols consumed in rats fed with the VOO diet (containing 30% virgin olive oil) (in the case of diet intake of 17 g per day) were about 20 mg per rat during the 28-day experimental period. In our study, the diet of the regular consumers of VOO contained around 50 ml of VOO per day, which supposes about 7 mg of olive oil phenols. The stimulation of noradrenaline and adrenaline secretions by olive oil phenols could be related to the greater concentration of these compounds quantified in the plasma of habitual consumers of VOO.

In summary, no specific phenolic structure related to virgin olive oil ingestion (hydroxytyrosol, tyrosol and their conjugate forms) was detected in the fasting plasma from the habitual VOO consumers, which suggests that phenols are completely metabolised eight hours after ingestion. The fact of not detecting food phenols in the plasma samples makes us believe that the structures quantified in the study could correspond to endogenous (i.e., non-dietary) metabolites, probably catecholamines or their metabolites, with similar chemical structures to phenols. Of special interest is that most of the compounds quantified showed a higher concentration in the fasting plasma from habitual VOO consumers. This suggests an indirect protective mechanism of long-term regular VOO consumption related to the protection of the endogenous antioxidant system.

## REFERENCES

- [1] Visioli F, Grande S, Bogani P, Galli C. Antioxidant properties of olive oil phenolics. In: Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P, editors. *Olive Oil and Health*. Oxfordshire, UK: CAB International; 2006. pp.109-116.
- [2] Fito M, Cladellas M, De La Torre R, Martí J, Alcántara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Bruguea J, Lopez-Sabater M.C, Vila J. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: A randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* 2005;181:149-58.
- [3] Llor X, Cabré E, Gassul MA. The effect of olive oil on inflammatory bowel disease. In: [236]Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P, editors. *Olive Oil and Health*. Oxfordshire, UK: CAB International; 2006. p. 309-314.
- [4] Visioli F, Galli C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002; 42: 209-21.
- [5] Gill CIR, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro GF, McGlynn H, Rowland I. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int J Cancer* 2005;117:1-7.
- [6] Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Morozzi G. Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21 WAF1/Cip1 and p27Kip1 and with induction of differentiation in HL60 cells. *J Nutr*. 2008; 138: 42-8.
- [7] Covas MI. Olive oil and cardiovascular system. Review. *Pharm Res*. 2007; 55: 175-86.
- [8] Servilli M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro GF, Morozzi G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chrom A* 2004; 1054: 113-27.
- [9] Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenol, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38: 647-59.
- [10] Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T, et al. Hidroxitirosol disposition in humans. *Clin Chem*. 2003; 49: 945-52.
- [11] Covas MI, de la Torre K, Farre-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fito M, Lopez Sabater MC, et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40: 608-16.
- [12] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18: 499-502.

- [13] Ruiz-Gutierrez V, Juan ME, Cert A, Planas JM. Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. *Anal Chem.* 2000; 72: 4458-61.
- [14] Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Department of Health and Human Services, 2001, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm> (Accessed September 2008).
- [15] Yuan YV, Kitts DD. Endogenous antioxidants: Role of antioxidant enzymes in biological systems. In: Shahidi F, editor. *Natural antioxidants. Chemistry, health effects, and applications.* Champaign, Illinois, USA: AOCS Press; 1997. p. 258-70.
- [16] Kushnir MM, Urry FM, Frank EL, Roberts WL, Shushan B. Analysis of catecholamines in urine by positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2002; 48: 323-31.
- [17] Gu Q, Shi X, Yin P, Gao P, Lu X, Xu G. Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2008; 609: 192-200.
- [18] Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Annals Clinical Biochemistry* 2004;41:17-38.
- [19] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 727-47.
- [20] Manach C, Scalbert A, Remesy C, Morand C. Consommation et biodisponibilité des polyphenols. In Sarni-Manchado P, Cheyner V, editors. *Les polyphenols en agroalimentaire.* Paris, France: Tec & Doc Lavoisier ; 2006 p. 361-90.
- [21] Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr.* 2001; 131: 1731-37.
- [22] Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1992; 32: 67-103.
- [21] Kadegal B. Catecholamines and their metabolites. *J Chrom.* 1988; 429: 177-233.
- [24] Aura AM. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev* 2008; 7: 407-29.
- [25] Siraki AG, O'Brien PJ. Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters. *Toxicology* 2002; 177: 81-90.
- [26] O'Brien, PJ. Radical formation during the peroxidase catalyzed metabolism of carcinogens and xenobiotics: the reactivity of these radicals with GSH, DNA, and unsaturated lipid. *Free Radic. Biol. Med.* 1988 ;4: 169-83.
- [27] Oxenkrug G, Requintina P, Bachurin, S. Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin and melatonin in the in vivo models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 939: 190-99.
- [28] Troadec JD, Marien M, Darios F, Hartmann A, Ruberg M, Colpaert F, Michel, PP. Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J. Neurochem.* 2001;79:200-10.



- [29] Clifford MN, Brown JE. Dietary flavonoides and health - Broadening the perspective. In Andersen ØM, Markham KR., editors. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, FL, USA: CRC Taylor & Francis, Group; 2006. pp. 319-70.
- [30] Tiihonen J, Hallikainen T, Lachman H, Volavka J, Hietala J, Pohjalainen T, et al. Association between the genetic polymorphism of the catechol-O-methyltransferase (COMT) and type 1 alcoholism. *Am J Med Genetics - Neuropsychiatric Genetics* 1998; 81: 516.
- [31] Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R, et al. Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Biochem*. 2007; 18: 685-92.





## **10. CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GLOBAL**



A pesar de los numerosos estudios que se han llevado a cabo durante las últimas décadas, en la actualidad todavía son necesarias numerosas evidencias científicas que avalen la función del aceite de oliva virgen en la prevención del estrés oxidativo, una de las primeras etapas de desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Un aspecto que está íntimamente relacionado con este papel es qué componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen son los de mayor interés y qué formas son las más activas.

Por tanto, es necesario continuar estos estudios en dos direcciones. Por un lado, establecer qué componentes de la fracción fenólica poseen una mayor capacidad antioxidante y cuáles son las concentraciones óptimas para ejercer su función, además de las posibles sinergias entre ellos. Hasta el momento, la mayor parte de los estudios se han centrado en el hidroxitirosol y en el tirosol, ignorando otras fracciones con potencial interés como los flavonoides, ácidos fenólicos o lignanos. Un segundo tema de interés consiste en establecer los mecanismos de absorción y metabolismo, así como la biodisponibilidad de estos grupos fenólicos.

En base a esta premisa, el trabajo de la presente tesis doctoral se planteó hacia dos grandes objetivos: (i) la evaluación de la capacidad antioxidante de los componentes de la fracción fenólica en diferentes modelos, cuyos resultados se han presentado en el Capítulos II (ii) y el estudio del metabolismo y biodisponibilidad de los componentes de la fracción fenólica, cuyos resultados se han presentado en el Capítulo III , y parcialmente en el Capítulo II.

## CAPÍTULO II: Determinación de la capacidad antioxidante en modelos *in vitro* y *ex vivo* de los componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen.

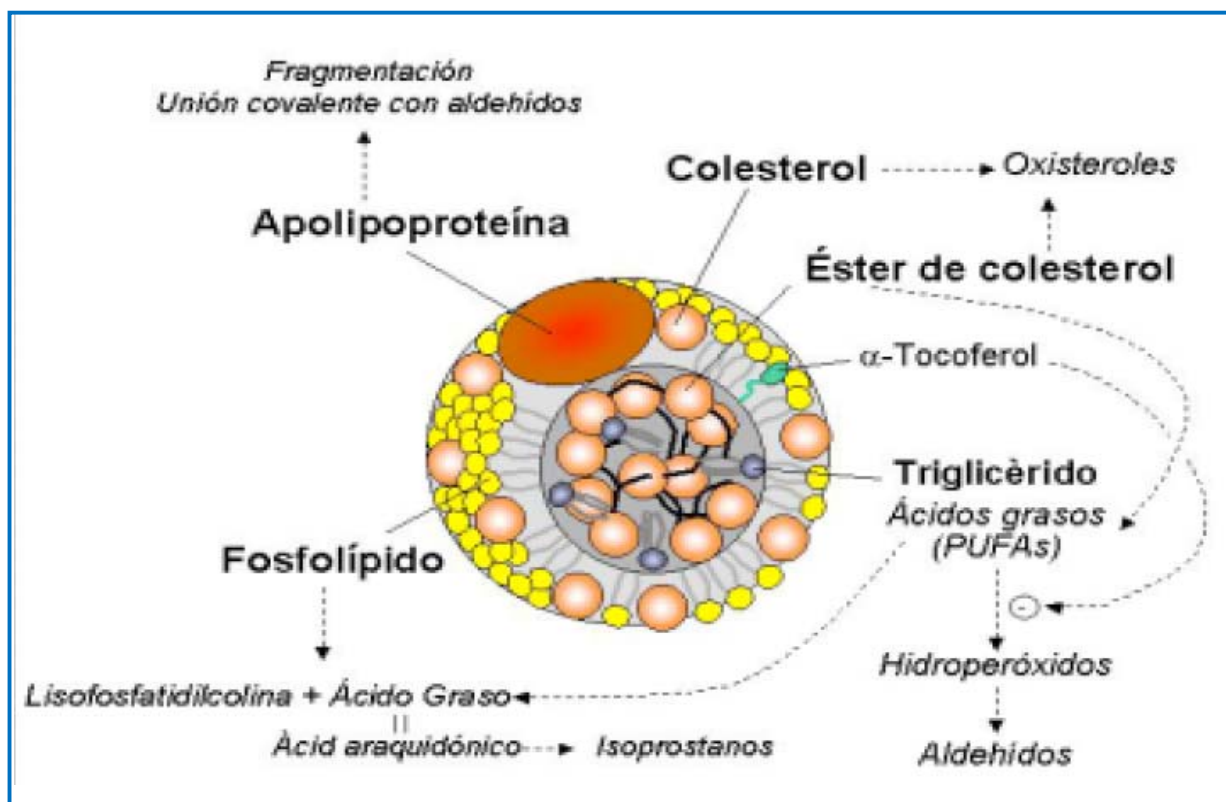
El objetivo planteado para esta primera fase del estudio fue la evaluación de la capacidad antioxidante de los distintos componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de forma individual. En este caso se seleccionó como sustrato de oxidación la LDL como marcador de los estados iniciales del desarrollo de la aterosclerosis.

Para caracterizar la capacidad antioxidante se realizaron estudios a dos niveles. Por un lado se intentó elucidar el mecanismo concreto por el cual cada compuesto fenólico podría ejercer su efecto protector a lo largo de las distintas etapas que conforman el proceso de oxidación completo de la LDL, mediante la aplicación de diferentes métodos de evaluación de actividad antioxidante. Por otro lado se cuantificó el poder antioxidante de cada fenol de manera individual, y se interpretaron las diferencias observadas entre ellos en base a su estructura química.

Se debe tener en cuenta que la medición directa de los compuestos de naturaleza antioxidante en sistemas biológicos es compleja debido a su corta vida. Por tanto, los métodos indirectos que se centran en determinar la concentración de los productos originados por la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas [1-4] son más empleados, ya que estos productos moleculares formados son más estables, lo cual facilita su determinación.

En este estudio se seleccionaron una serie de metodologías que permitieron estudiar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos en cada una de las etapas por las que

transcurre la oxidación de las LDL: fase de latencia, fase de propagación, fase de descomposición y fase de oxidación proteica. En cada una de estas fases los sustratos de estudio fueron las diferentes estructuras que forman la LDL: lípidos, fosfolípidos y proteínas, respectivamente. Además se planteó un último test para determinar la capacidad protectora de los fenoles frente a la citotoxicidad de la LDL oxidadas sobre la unidad celular. En la **Figura D 1** se muestra un esquema de los procesos de oxidación de la LDL en función del sustrato de oxidación.



**Figura D 1.** Esquema de los procesos de oxidación de las distintas estructuras que conforman las LDL.

Para evaluar la eficacia antioxidante en la **primera fase** del proceso de oxidación lipídica de la LDL, se empleó el **método de determinación de dienos conjugados**. El método consiste en la inducción de la oxidación con  $\text{Cu}^{++}$  y la posterior determinación de la etapa de latencia mediante la monitorización de la formación de dienos conjugados espectrofotométricamente a 234 nm. Es el método más ampliamente aceptado a pesar de ser una medida indirecta de la peroxidación lipídica.

Como se ha indicado anteriormente, estos compuestos se originan al comienzo de la oxidación de la fracción lipídica de la LDL. En nuestro estudio la inducción oxidativa *ex vivo* de la LDL se forzó bajo las condiciones siguientes: 6  $\mu\text{M}$  de cobre a 30° C durante 5h. En estas condiciones se induce la oxidación dando lugar a la formación de dienos conjugados que producen aumento de la absorbancia a 234 nm hasta alcanzar un máximo. Se determinó la fase de latencia o tiempo de resistencia en presencia de una determinada

concentración fenólica y como control de protección se utilizó el  $\alpha$ -tocoferol. En una primera experiencia se estudió la relación dosis respuesta en un rango de concentración en el medio entre 0 y 20  $\mu\text{M}$  de fenol. De este modo se pretendió establecer para cada compuesto fenólico de forma individual la concentración mínima necesaria para inhibir totalmente la oxidación de la LDL.

En una segunda experiencia se evaluó el periodo de latencia en presencia de una concentración 0,5  $\mu\text{M}$  de compuesto fenólico. Se empleo esta concentración para simular en la medida de lo posible las condiciones fisiológicas. Una vez analizado el efecto de cada compuesto de manera individual, se llevó a cabo la evaluación del potencial sinergismo entre los compuestos fenólicos que habían mostrado una eficacia antioxidante superior al  $\alpha$ -tocoferol.

Una vez evaluada la actividad antioxidante en la primera etapa de oxidación de la LDL se llevaron a cabo estudios para evaluar la eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos en la **segunda etapa de oxidación**, o **fase de propagación**. Para ello el método empleado fue la cuantificación de los fosfolípidos oxidados: PLPC (1-palmitoyllysophosphatidylcholine), SGPC (1-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), OGPC (1-oleoylglycerophosphocholine), POVPC (1--palmitoyl-2-(5-oxovaleryl)-sn-glycero-3-phosphocholine) y PGPC (1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine) mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de masas de tiempo de vuelo (TOF).

Finalmente, se determinó la efectividad de los compuestos fenólicos como antioxidantes en la **tercera etapa** o **fase de descomposición**. El método empleado en este caso fue la identificación y cuantificación de aldehídos formados en la fase final de oxidación de la LDL: MDA (malondialdehyde), GSA (Glutamic semialdehyde) y AASA (Amino adipic semialdehyde), mediante una cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.

Una vez evaluada la eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en las diferentes etapas del proceso de oxidación de la fracción lipídica de la LDL, se llevó a cabo un estudio sobre su efectividad para inhibir **la oxidación de la fracción proteica** de la LDL. La oxidación de la parte proteica puede ser consecuencia de la oxidación de la parte lipídica, pero en ocasiones resulta ser la primera etapa de oxidación de la LDL, por lo que resulta muy interesante conocer qué compuestos minimizan este proceso. Con este objetivo se llevó a cabo un ensayo que permitía monitorizar la formación de grupos carbonilo, productos de oxidación de la ApoB, por el método de Western-blot. En este caso, la inducción de la oxidación se realizó mediante 5  $\mu\text{M}$  de cobre a 37° C durante 4h.

El análisis de los resultados ha revelado que la eficacia en la prevención de la oxidación de la LDL de un mismo compuesto fenólico es diferente en función del método. Con el objetivo de comparar los resultados de los diferentes métodos de ensayo de actividad antioxidante se ha elaborado una tabla resumen en la que quedan ordenados los compuestos fenólicos en función de su potencial antioxidante y su momento de acción durante el proceso de oxidación de la LDL (**Tabla D1**). En las tres primeras columnas los compuestos quedan ordenados en función de la eficacia antioxidante que han demostrado para inhibir la oxidación de la parte lipídica de la LDL en las etapas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>. En la

primera columna se diferencia entre los efectos de una concentración fisiológica (0.5µM) y los efectos en función de la concentración (0-20µM). En las otras dos columnas se ordenan de forma particular en función de los distintos marcadores seleccionados: fosfolípidos oxidados y aldehídos. En la cuarta y quinta columna se recoge el orden de los compuestos fenólicos en función de su poder para inhibir la oxidación de la fracción proteica de la LDL. En primer lugar, en función de la inhibición de grupos carbonilos. En segundo lugar, en función de cómo se modifica el índice de peroxidabilidad. En la última columna se ordenan los compuestos en función de su capacidad para evitar la citotoxicidad celular, tanto sobre células endoteliales como sobre células hepáticas. Los números de las posiciones en **rojo** indican que los efectos de esos compuestos eran significativamente diferentes a los resultados control (efecto del tocoferol), por el contrario los números en **morado** indican que los resultados no fueron diferentes al control de manera significativa. Los números en **verde** pertenecen a aquellos compuestos cuyo efecto antioxidante fue inferior al producido por el control. Las siglas PO indican efecto peroxidante.

En general, los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres al ceder un hidrogeno de sus grupos hidroxilo, formándose un puente de hidrogeno entre los dos grupos cercanos lo que genera un radical libre relativamente estable que frena la cadena de reacciones de oxidación. Por tanto, y en términos generales, a mayor número de grupos hidroxilo y en posición orto (grupo catecol) en la molécula fenólica, su capacidad antioxidante es más elevada [5-7]. Además, la presencia del anillo aromático les permite mantener en resonancia al electrón desapareado, al igual que la presencia de dobles enlaces, lo que hace que sus formas radicalarias sean mucho mas estables. Pero se debe tener en cuenta que durante la peroxidación un mayor número de grupos hidroxilo puede disminuir la actividad antioxidante, pues estos hacen que la molécula sea menos lipófila, teniendo más dificultad de acceso a las membranas celulares [8].

También es importante recordar que los compuestos fenólicos por un lado presentan capacidad antioxidante pero por otro pueden actuar como prooxidantes. Existen dos factores que minimizan este último comportamiento: la mayor estabilidad del electrón desapareado por resonancia debido a los dobles enlaces, y la esterificación de los grupos carboxilo terminales. En la **TablaD2** se resumen las principales características moleculares de los compuestos fenólicos del aceite de oliva que determinan su poder antioxidante. Estas características son el número total de grupos OH y en especial el numero de OH dentro del anillo y en posición -orto, el número de anillos aromáticos, el hecho de ser o no ácidos cinámicos, el tener o no un grupo-CH<sub>3</sub>O, el tener o no un grupo dihidroxi en el anillo B, el numero de dobles enlaces y en particular dentro de la estructura eleno, la presencia de un grupo carboxilo terminal esterificado. Generalmente, a más grupos o la presencia de estas formas mejora la capacidad antioxidante. Todo lo contrario suele pasar con la presencia de azúcares en la estructura, su existencia tiende a disminuir la capacidad antioxidante.

En función de su mecanismo de acción se puede hablar de tres tipos de antioxidantes. Un primer grupo correspondería a los antioxidantes que actúan dentro o fuera de la célula, un segundo que actuaría de una manera directa protegiendo el sustrato oxidable y un tercer grupo que actuaría de manera indirecta mediante la estimulación de los mecanismos endógenos [9].



Los **antioxidantes primarios** son aquellos que actúan evitando el desarrollo de la **1ª etapa de oxidación lipídica: Etapa de latencia**. Su mecanismo de acción es diverso: (i) impiden la formación de radicales libres [6,9] (ii) quelan los metales de transición que intervienen en las reacciones de formación de los radicales libres, además de proteger así los antioxidantes endógenos o restaurar sus formas reducidas (iii) están involucrados en la liberación de enzimas antioxidantes al interactuar con receptores de la membrana (reducen la activación de las lipooxigenasas, inducen la actividad de los enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasas y glutatión peroxidada) (iv) están involucrados en la modulación de la expresión de genes responsables de la síntesis de enzimas antioxidantes o en la restauración de la expresión del RNAm [10,11].

Los **antioxidantes secundarios** son capaces de interrumpir la reacción de propagación por inactivación o por desplazamiento de las especies activas del oxígeno. En este grupo quedarán todos aquellos que son más eficaces a la hora de inhibir o minimizar los efectos de **la etapa de propagación y descomposición lipídica**.

Los **antioxidantes terciarios** actúan reparando el daño causado a las moléculas, o bien eliminando las moléculas dañadas. Aquí pueden incluirse los compuestos fenólicos que eviten al máximo la **citotoxicidad producida por la partícula de LDL oxidada** sobre las células endoteliales.

**Tabla D 1.** Clasificación de los diferentes compuestos fenólicos en función su actividad antioxidante en los distintos modelos.

COMPUESTO	Inhibición de la 1ª etapa de oxidación de la fracción lipídica de la LDL	Inhibición de la 2ª etapa de oxidación de la fracción lipídica de la LDL	Inhibición de la 3ª etapa de oxidación de la fracción lipídica de la LDL	Inhibición de la etapa de oxidación de la fracción proteica de la LDL	Efectos sobre el índice de Peroxidabilidad	Citotoxicidad						
	(0.5µM)	(0-20µM)	PLPC	SGPC	POVPC	PGPC	GSA	AASA	MDAL	IP	HMEC	HepG2
luteína	1	2	8	8	8	8	5	7	8	5	2	1
rutina	2	2								16		
hidroxitirosol	3	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	3
oleuropeína	4	3							PO			
3,4-DHPEA-EDA	5	5	3	2	4	3	6	8	7	7	7	4
α-tocoferol	6											
p-HPEA-EDA	7	4	5	4	3	5	8	6	6	8	6	2
ac. cafeico	8	2	2	5	1	1	4	3	3	4	3	7
acetoxipinoresinol	9	3	4	3	2	2	3	2	4	6	4	6
luteína-7-O-g	10	2							9			
vainillina	11	4							13			
pinoresinol	12	5	6	6	6	4	2	4	2	3	2	8
ac. p- cumarico	13	4							14			
apigenina	14	5							PO			
tirosol	15	5							PO			
apigenina-7-O-g	16	4							PO			
verbascosido	--	1							10			
3,4-DHPEA-AC	--	4							12			
ac. gálico	--	3	7	7	7	7	7	5	2	5	8	5
met 3,4-DHPEA-EA									11			
ac. ferúlico	PO	5							15			

.Numero: diferencia significativa. Numero: diferencia no significativa. Numero: menos capacidad antioxidante que el tocoferol

**Tabla D 2.** Resumen de las características moleculares de cada compuesto fenólico determinantes de su capacidad antioxidante.

COMPUESTO	N° de OH en el anillo fenólico	N° de OH fuera del anillo fenólico	N° total de OH en la molécula	N° de OH posición orto	N° de anillos fenólicos	Ácido cinámico	Con grupo CH <sub>3</sub> O	En anillo un grupo diOH	Presencia de azúcar B	Presencia de enlaces dobles en la estructura eleno	N° de enlaces totales	Grupo carboxilo terminal esterificad
rutina	4	5	9	1	3	no	no	2 de 6	2 de 6	no	8	0
verbascosido	4	3	7	2	2	no	no	1 de 6	1 de 6	no	8	0
lutena	4	0	4	1	3	no	no	0	0	no	8	0
ac. gálico	3	1	4	2	1	no	no	0	0	no	4	0
lutena-7-O-g	4	0	4	1	3	no	no	1 de 5	1 de 5	no	8	0
hidroxitirosol	2	1	3	1	1	no	no	0	0	no	3	0
ac. caféico	2	1	3	1	1	si	no	0	0	no	5	0
vainillina	2	1	3	0	1	si	si	0	0	no	4	0
apigenina	3	0	3	0	3	no	no	0	0	no	8	0
3,4-DHPEA-EDA	2	0	2	1	1	no	no	0	0	si	7	0
acetoxipinoresinol	2	0	2	0	2	no	no	0	0	no	7	1
pinoresinol	2	0	2	0	2	no	no	0	0	no	6	0
met 3,4-DHPEA-EA	2	0	2	1	1	no	no	0	0	si	7	1
3,4-DHPEA-AC	2	0	2	1	1	no	no	0	0	no	4	1
ac. p- cumarico	1	1	2	0	1	si	no	0	0	no	5	0
ac. ferulico	1	1	2	0	1	si	si	0	0	no	5	0
oleuropeina	2	0	2	1	1	no	no	1 de 5	1 de 5	no	7	0
tirosol	1	1	2	0	1	no	no	0	0	no	3	0
apigenina-7-O-g	2	0	2	0	3	no	no	1 de 5	1 de 5	no	8	0
p-HPEA-EDA	1	0	1	0	1	no	no	0	0	si	5	1

Los resultados de nuestro estudio muestran que muchos de los compuestos fenólicos pueden actuar mediante más de uno de los mecanismos descritos. Si comparamos los resultados (**Tablas D1**) por subfamilias de compuestos fenólicos se pueden extraer diferentes conclusiones.

Dentro de los **alcoholes feniletílicos** estudiados, el **hidroxitirosol o 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (3,4-DHPEA)** (**Figura D2**) presenta una importante capacidad antioxidante en cualquiera de las etapas de oxidación de las LDL. Sin embargo el **tirosol o 2-(4-hidroxifenil etanol) (*p*-HPEA)** (**Figura D2**), presenta una capacidad antioxidante muy débil y además tan sólo en las primeras etapas de la oxidación de la fracción lipídica de la LDL ya que cuando estudiamos la oxidación en la fracción proteica muestra incluso, un efecto prooxidante. Son numerosos los estudios llevados a cabo durante los últimos años que han demostrado la potente capacidad antioxidante del hidroxitirosol evaluada mediante diferentes métodos, entre los que se incluye la técnica de dienos conjugados, el uso de los oxidantes superóxido y ácido hipocloroso, y del sistema enzimático xantina-xantina oxidasa [6,12,13]. En estos trabajos ya se indicaba que los mecanismos antioxidantes del hidroxitirosol frente a la oxidación lipídica de la LDL, podrían ser la quelación de iones metálicos y/o el secuestro de radicales libres. Posteriormente Carr y col. [14], demostraron cómo la cloración de la fracción de apoproteína de la LDL iniciaba la peroxidación de la lipoproteína. Conectando ambos estudios, podemos entender por que este compuesto ha resultado ser un potente antioxidante en las distintas etapas de la oxidación de la LDL. Estos datos, junto con los obtenidos en este trabajo, refuerzan esta teoría. El hidroxitirosol, mediante la donación de hidrogeniones es capaz de neutralizar los radicales libres que se generan durante las primeras etapas del proceso de oxidación de la LDL. Además, su forma radicalaria es muy estable, debido por un lado al impedimento estérico que supone la presencia de los dos grupos hidroxilo en posición orto y por otro lado, a la deslocalización por resonancia del electrón desapareado gracias a la presencia del anillo aromático. Ambos factores provocan una carencia de posiciones adecuadas para el ataque de agentes oxidantes. Por el contrario el tirosol tan solo tiene un grupo hidroxilo, que además se encuentra en posición para, lo que explica la dificultad de conseguir una forma radicalaria estable y en consecuencia su baja actividad antioxidante, pese a que su estructura química es muy similar a la del hidroxitirosol. Estas diferencias en la actividad antioxidante de estos dos componentes característicos de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen ya han sido demostradas en diferentes estudios. Así Manna y col [15-17] en un modelo de células epiteliales intestinales indujeron el estrés oxidativo mediante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el sistema xantina-xantina oxidasa, enzima involucrado en el proceso de carcinogénesis, y evidenciaron la eficacia del hidroxitirosol frente a la falta de efectividad del tirosol. De forma similar [18] evidenciaron que la capacidad antioxidante de las moléculas fenólicas reside en la posición orto de los grupos hidroxilo, característica que presenta el hidroxitirosol pero no el tirosol.

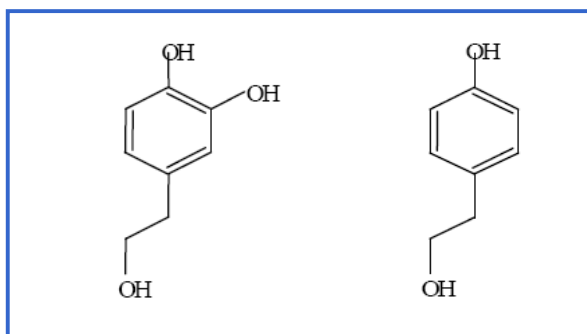


Figura D 2. Hidroxitirosol y tirosol

Los **ácidos fenólicos y sus derivados**, a diferencia de otras fuentes vegetales, no son una fracción mayoritaria en el aceite de oliva virgen. Sin embargo, su introducción en el estudio se consideró de interés y para ello se seleccionaron el **ácido cafeico**, **ácido *p*-cumárico**, **ácido ferúlico**, **ácido gálico** y **vanillina (Figura D3)**. Los resultados han mostrado que la máxima actividad antioxidante frente a la fracción lipídica de la LDL corresponde al **ácido cafeico**. Sin embargo, cuando la diana de la oxidación es la fracción proteica o la unidad celular, el **ácido gálico** es el que mayor acción protectora ejerce frente a la oxidación. El ácido cafeico pertenece al grupo de los ácidos cinámicos. Se considera que estos al tener más dobles enlaces en su estructura básica que los ácidos benzoicos (ácido gálico) presentan una mayor capacidad para deslocalizar los electrones desapareados en su forma radicalaria y por tanto frenan las reacciones de oxidación. Con los resultados obtenidos se podría decir que esta condición es importante en los procesos de oxidación lipídica, mientras que para evitar la oxidación proteica o la muerte celular, la existencia de un mayor número de grupos OH, con capacidad de donar protones y neutralizar así los radicales libres resulta mucho más efectiva. Tras estas diferencias, el orden de capacidad antioxidante de mayor a menor grado tanto para la protección de la fracción lipídica como de la fracción proteica es la siguiente: la **vanillina**, seguida del **ácido *p*-cumárico** y por último el **ácido ferúlico (Tabla D1)**. En este caso el número de grupos OH podría ser la explicación de las diferencias de potencial, pues la vanillina presenta dos grupos unidos al anillo aromático, mientras que los otros dos ácidos tan solo tienen uno. La diferencia entre el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico, podría ser debida a la única diferencia estructural que mantienen, la existencia de un grupo CH<sub>3</sub>O- unido al C<sub>5</sub> del anillo fenólico en el ácido ferúlico.

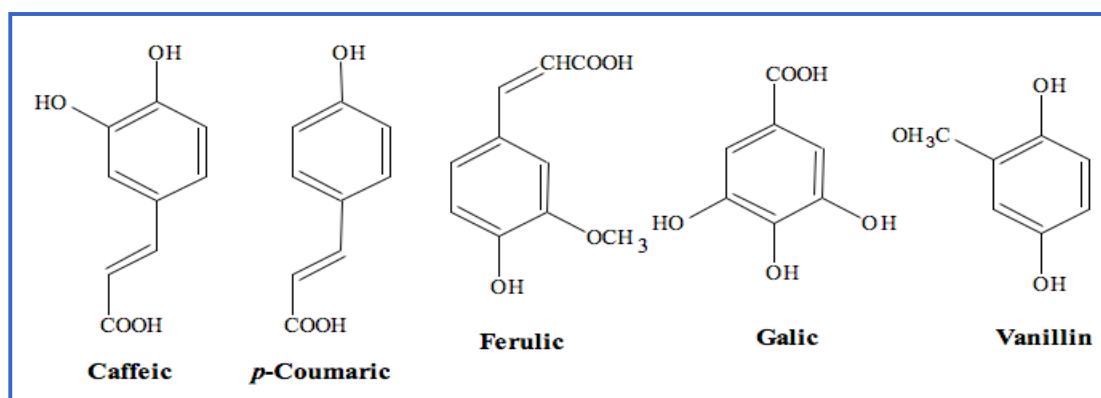
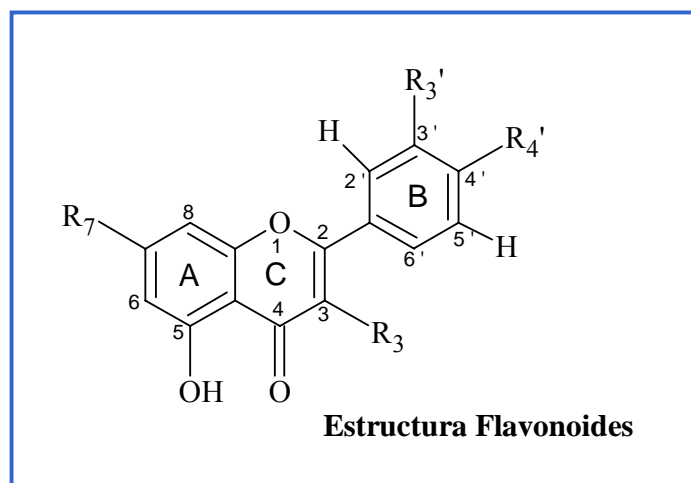


Figura D 3. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos.

Los flavonoides constituyen una de las fracciones mayoritarias del fruto de la oliva. Durante el proceso de extracción del aceite, en parte se transfieren al aceite constituyendo una de las fracciones mayoritarias del aceite de oliva virgen que sin embargo no ha sido muy estudiada. Se ha demostrado que el consumo de flavonoides está asociado a una reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares en diversos estudios epidemiológicos prospectivos [19,20]. El efecto antioxidante y el protector cardiovascular fue confirmado y aceptado por la comunidad científica en el estudio ZUTPHEN [21], realizado con una cohorte de 800 individuos, en el que se describió una correlación inversa entre la cantidad de flavonoides procedentes de la dieta (principalmente té y cebollas) y la incidencia de cardiopatía isquémica. Asimismo se sabe que los flavonoides, además de captar radicales libres, tienen la propiedad de captar algunos enzimas responsables de la producción de radicales (ROS) como la xantina-oxidasa [22,23]. Esta capacidad depende en gran medida de la estructura de la molécula. Para inhibir este enzima, el fenol debe presentar una estructura coplanar (con un doble enlace en la posición 2 y 3 del anillo C) y los grupos hidroxilo en la posición 5 y 7 del anillo A. Por el contrario, si aparecen formas glicosiladas en la posición 6 y 8, se crean interacciones estéricas y la actividad disminuye [22].

Como representantes de los flavonoides del aceite de oliva en nuestro estudio, la caracterización del potencial antioxidante se ha realizado para la **luteína**, la **apigenina**, las **formas glucosiladas** de ambas y para la **rutina**. Se han descrito dos mecanismos de acción antioxidante de los flavonoides, siendo por un lado donadores de hidrogeno y por otro lado agentes quelantes de metales. Este último mecanismo será de especial interés en los modelos en los que la inducción de la oxidación se lleva a cabo con  $\text{Cu}^{2+}$  [24]. En general se ha demostrado que la máxima capacidad quelante la presentan las estructuras que contienen los grupos hidroxilo en posición 5 y 7 del anillo A, en la 3' y 4' del anillo B y en la 3 del anillo C, además del doble enlace entre la posición 2 y 3 del anillo C conjugado con un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C [11,22]. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los diferentes test empleados en nuestro estudio. La **rutina**, **luteolina** y **luteolina-7-O-glucósido**, poseedoras de el dihidroxi en posición 3' y 4' del anillo B, presentan mayor capacidad antioxidante que la **apigenina** y **apigenina 7-O-glucósido**, que no poseen esta conformación en su molécula (Figura D4).

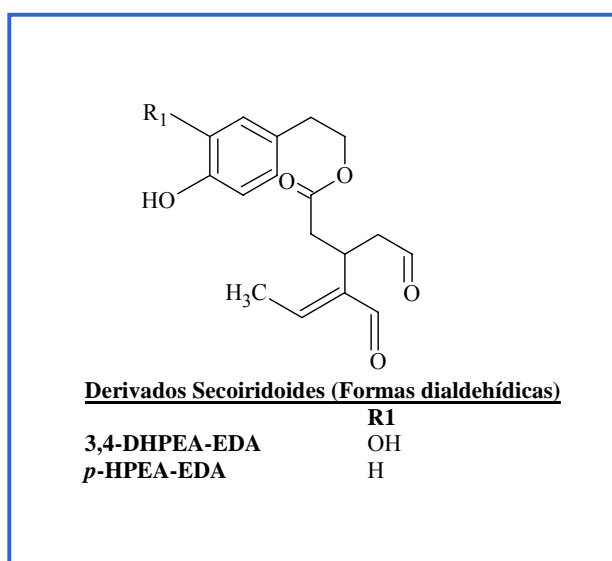


**Figura D 4.** Estructura básica de los flavonoides.

Otra diferencia estructural que determina la capacidad antioxidante de los flavonoides está relacionada con la presencia de un azúcar en su molécula [25,26]. En todas los modelos estudiados, la capacidad antioxidante de las formas glucosiladas (**luteolina-7-O-glucósido** y **apigenina 7-O-glucósido**) es menor que la de sus respectivas formas aglicona, (**luteolina** y **apigenina**). Esta reducción de la actividad antioxidante es consecuencia de la unión del azúcar a alguno de los grupos hidroxilo. También la presencia de estos grupos puede crear interacciones estéricas que inhiben su potencial. Por último, se observa cómo la **rutina** muestra una capacidad antioxidante menor que la luteolina frente a la lipoperoxidación a pesar de tener un mayor número de grupos hidroxilo. Este mayor número de grupos hidroxilo en la molécula de rutina podría hacerla menos lipófila, dificultando su acceso a la fracción lipídica de la LDL [8]. Otro factor que podría reducir su eficacia, en relación con la luteolina de estructura similar, podría ser la presencia de un azúcar doble en posición 3 en el anillo C de la rutina frente al H libre en esta misma posición en la luteolina [27].

Los **secoiridodes** son los componentes mayoritarios de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen. Este grupo fenólico está formado por derivados de la oleuropeína y del ligustrósido, fenoles mayoritarios de la oliva, que durante el proceso de extracción del aceite, por efecto del medio ácido de la pasta y de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, pierden la molécula de glucosa formando los derivados secoiridoides o formas agliconas. Para la evaluación de la actividad antioxidante de esta fracción se seleccionaron la **forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA)**, la **forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol (p-HPEA-EDA)**, el **4-acetoxietil-1,2-dihidroxibenceno (3,4-DHPEA-AC)**, y la **forma metilada de la oleuropeína aglicona (metilada del 3,4-DHPEA-EA)**, además de la **oleuropeína** como forma glucosilada. Los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante del **3,4-DHPEA-EDA (Figura D 5)** han mostrado una buena actividad en todos los modelos, lo que indica una buena eficacia independientemente de la etapa de oxidación o de la fracción oxidable (lipídica o proteica). De forma similar a lo observado con el hidroxitirosol y el tirosol, el **p-HPEA-**

EDA (Figura D 4) ha mostrado una actividad antioxidante más baja. Estas diferencias se podrían atribuir a la presencia en la molécula de **3,4-DHPEA-EDA** de los 2 grupos hidroxilo en posición orto en el anillo aromático, lo que permite una fácil deslocalización electrónica que favorece la neutralización de los radicales libres formados en las primeras etapas del proceso de oxidación de la LDL. Además la presencia de los cuatro dobles enlaces aportados por la molécula de ácido elenólico podrían complementar la deslocalización del electrón desapareado que ya tiene lugar gracias al anillo aromático. En cambio, el *p*-HPEA-EDA sólo presenta 1 grupo hidroxilo y además en posición para, pese a contener también los cuatro dobles enlaces aportados por el elenólico.



**Figura D 5** Estructura química de las formas dialdehídicas.

Estas diferencias en la actividad antioxidante del 3,4-DHPEA-EDA y del *p*-HPEA-EDA ya fueron observadas en estudios previos llevados a cabo mediante test DPPH, modelo liposomas (modelo lipídico polar) y modelo del metil-linoleato (MeLo) (modelo lipídico apolar) [28]. De manera similar, un estudio llevado a cabo por Artajo y col.[29] con matrices oleosas enriquecidas con estos compuestos fenólicos en el que se determinó la actividad antioxidante mediante el método Rancimat mostró una mayor eficacia antioxidante del 3,4-DHPEA-EDA.

El **3,4-DHPEA-AC (Figura D6)** con una estructura catecol pero sin el ácido elenólico, no ha mostrado capacidad antioxidante a la hora de inhibir la oxidación de la fracción lipídica de la LDL. Sin embargo, sí ha mostrado un cierto grado de protección de la apoproteína frente a la oxidación inducida por Cu<sup>++</sup>. En base a los resultados obtenidos con el grupo de los secoiridoides se podría decir que, con este grupo de compuestos, la facilidad de deslocalizar el electrón podría mejorar algo más la capacidad antioxidante durante la etapa de oxidación proteica de la LDL que el hecho de presentar una estructura catecol.



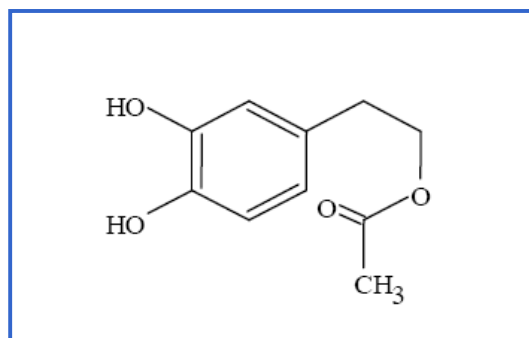


Figura D 6. Estructura del 4-acetoxietil-1,2-dihidroxibenceno (3,4-DHPEA-AC)

La **oleuropeína** (Figura D 7) es el caso más particular dentro de los secoiridoides. Esta molécula ha mostrado el potencial antioxidante más elevado de los cuatro compuestos estudiados a la hora de proteger la oxidación de la LDL en las primeras etapas de peroxidación. Sin embargo se ha mostrado prooxidante en los modelos de evaluación de la capacidad antioxidante frente a la fracción proteica de la LDL. Si comparamos su estructura química con el **3,4-DHPEA-EDA** (segundo en capacidad antioxidante en la primera etapa de oxidación lipídica y primero dentro de los secoiridoides en inhibir la oxidación proteica) vemos que la única diferencia es que la oleuropeína presenta cerrado el anillo en la parte del ácido elenólico, además de la presencia de una molécula de glucosa.

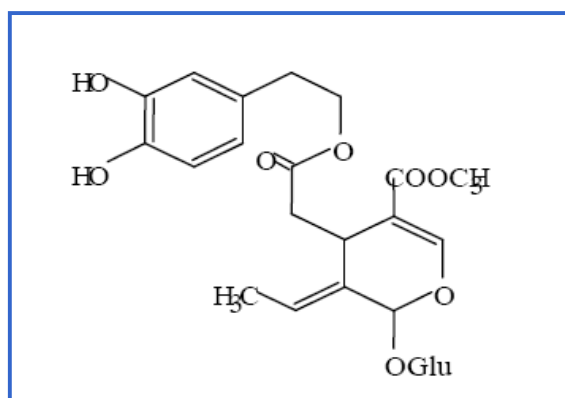
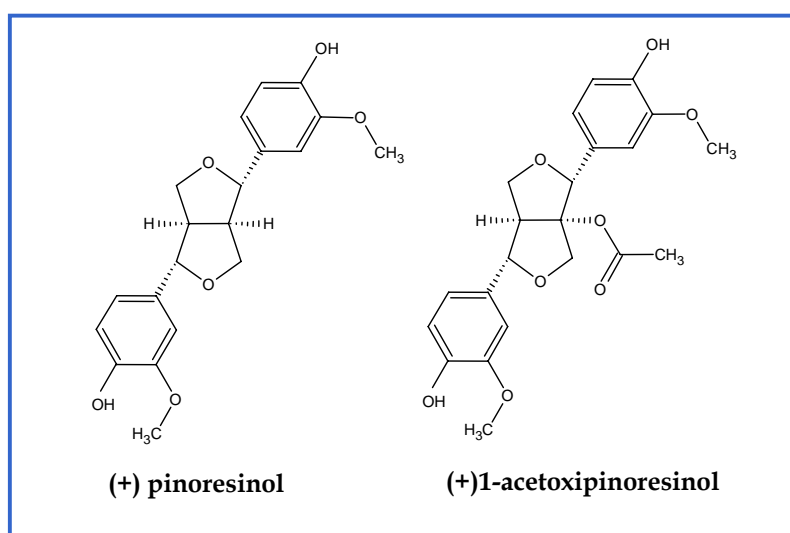


Figura D 7. Estructura química de la oleuropeína

Son numerosos los estudios *in vitro* que han demostrado que la oleuropeína actúa como potente inhibidor de la oxidación de la LDL [6,30,31], evidenciando una actividad antioxidante igual o superior a la de otros antioxidantes conocidos como la vitamina E, Vitamina C y el hidroxitolueno butirato (BHT) [32].

En relación con la actividad antioxidante de los **lignan** (Figura D8), los resultados han mostrado una inhibición de la oxidación mucho más eficaz por parte del

**acetoxipinoresinol** en las primeras etapas de lipoxidación, mientras que el **pinoresinol** se ha mostrado más efectivo en los modelos de evaluación de la oxidación de la fracción proteica de la LDL. Por otra parte ninguno de los dos lignanos ha ejercido una protección significativa frente al efecto citotóxico de la LDL oxidada sobre las células endoteliales y hepáticas.



**Figura D 8.** Estructura de los lignanos más abundantes en el aceite de oliva virgen.

El mecanismo de acción antioxidante de este grupo fenólico no está del todo claro, aunque la mayor parte de las hipótesis apuntan a que podrían actuar como quelantes de metales. Este mecanismo quelante fue evidenciado por [28] en un estudio en el que se evaluó la capacidad antioxidante de diferentes fenoles del aceite de oliva virgen por diferentes métodos. Los resultados mostraron que los lignanos actuaban como antioxidantes tan sólo en los modelos que utilizaban metales como inductores de la oxidación. En esta línea se ha asociado la ingestión de alimentos ricos en lignanos con una protección frente a la neoplasia de colon, próstata y mama [33].

En relación con la capacidad antioxidante del **verbascósido (FiguraD9)**, a pesar de la presencia de dos anillos catecol con dos grupos hidroxilo en posición orto, no ha mostrado una capacidad antioxidante significativa en ninguno de los modelos estudiados.

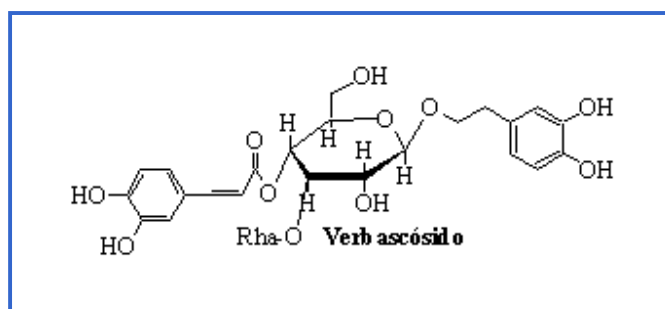


Figura D 9 Estructura química del verbascosido.

Como síntesis de los resultados obtenidos cabe destacar que los **flavonoides con estructura ortodihidroxifenólica** muestran la mayor efectividad en la inhibición de la primera etapa de oxidación de la LDL, mediante la inhibición de la formación de dienos conjugados. Además, muestran una mayor capacidad para contrarrestar la citotoxicidad de la LDL oxidada en contacto con las células endoteliales y hepáticas. Sin embargo, la defensa que ejercen frente a la oxidación de la fracción proteica de la LDL, así como frente a la inhibición de los marcadores seleccionados de oxidación de las etapas 2 y 3 de la peroxidación, es bastante menos importante.

Estas diferencias podrían estar relacionadas con los diferentes mecanismos de actividad antioxidante de los flavonoides [34,35]: (i) la inactivación radicalaria de ROS, para lo que es básico generar un radical más estable y menos dañino tras la reacción con el radical libre (ii) la regeneración de antioxidantes endógenos (iii) la quelación de cationes de metales de transición capaces de promover la formación radicalaria por la reacción de Fenton y (iv) la inhibición de enzimas involucrados en la producción de los ROS.

Se podría decir que el primer (i) y último (iv) mecanismo de acción justificarían el hecho de que sean más eficaces durante la 1ª etapa de peroxidación lipídica (etapa de latencia), donde son los ROS los activadores de la oxidación y los antioxidantes endógenos la primera barrera defensiva. También su acción quelante podría hacerlos más efectivos en estas etapas de iniciación. Por otro lado su capacidad de inhibir enzimas productores de ROS, podría detectarse mejor con los test celulares, y por ello de nuevo aquí aparecen en los primeros puestos de capacidad antioxidante. Una vez desencadenada la oxidación, sus propiedades estructurales puede que ya no sean las idóneas para ralentizarlo.

Además de las características estructurales, es conocido que la capacidad antioxidante de los flavonoides en particular y de los fenoles en general, varía en función de su solubilidad relativa en fase acuosa o lipofílica. Los flavonoides presentan un coeficiente de partición intermedio, que depende de su estructura básica y de sus sustituyentes asociados. Por ejemplo, la unión de azúcares les hace ser más hidrosolubles pero disminuye su actividad antioxidante, hecho que se comprueba con los resultados obtenidos en nuestro estudio [36]. Los flavonoides del aceite presentan un carácter más apolar que el resto de los componentes de la fracción fenólica, lo cual explicaría su mayor actividad antioxidante durante la peroxidación y a nivel celular, en comparación con el resto de compuestos

estudiados, además de la tendencia de fenoles de tipo flavonoides a ligarse a la LDL humana tras su ingesta [37].

De todo el conjunto de componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen, se puede considerar al **hidroxitirosol** como el que más poder y espectro de acción tiene **como agente antioxidante de las LDL**. Tan solo aparece en la escala establecida por debajo de la posición 3 (**Tabla D1**) cuando se determina el poder antioxidante para inhibir la 2ª etapa de oxidación de la fracción lipídica empleando como marcador de daño oxidativo la presencia del fosfolípido oxidado PGPC.

Otro aspecto destacable es el comportamiento prooxidante, en función de la concentración, observado con algunos compuestos fenólicos en el modelo de determinación de grupos carbonilo como productos de oxidación de las apolipoproteínas. De manera similar, este comportamiento ha sido observado en otros antioxidantes como por ejemplo el tocoferol que a altas concentraciones puede ser prooxidante por la generación de radicales libres. El ácido ascórbico también a altas concentraciones puede actuar como prooxidante en presencia de metales de transición, induciendo a la peroxidación lipídica por su capacidad de reducir el  $Fe^{+++}$  a  $Fe^{++}$ , el cual es un potente inductor a radicales libres. También se ha visto que el  $\beta$ -caroteno puede actuar como prooxidante o antioxidante en función de distintas propiedades intrínsecas como puede ser el potencial redox de la matriz biológica donde se encuentra [38], incluso a bajas concentraciones.

Tras el **screening con el test de detección de carbonilos como productos de oxidación de la apoproteína** se seleccionaron aquellos compuestos más antioxidantes. Estos fueron evaluados con otra serie de test donde mostraron resultados diversos en función del compuesto fenólico y, en algunos casos, de la concentración ensayada. Por un lado, frente a la inhibición de formación de fosfolípidos oxidados correspondiente a la **2ª etapa de la oxidación lipídica**, encontramos que el **hidroxitirosol** es el compuesto más protector frente a la formación de los 4 tipos de fosfolípidos oxidados que se evalúan. Mientras, el ácido cafeico, el acetoxipinoresinol, el 3,4-DHPEA-EDA, el *p*-HPEA-EDA y el pinoresinol muestran resultados diversos, aunque se podría decir que su actividad antioxidante se mueve de mayor a menor en el orden que se muestra (**Tabla D1**). De nuevo con el **ácido gálico y la luteolina** los resultados quedan consensuados para los 4 tipos de fosfolípidos oxidados. Estos dos fenoles son los menos eficaces para frenar o retardar la etapa de propagación de la peroxidación lipídica, la luteína inclusive no ejerce efecto significativo sobre SGPC. De manera similar, cuando valoramos cómo afecta la presencia fenólica en la **etapa de descomposición de la peroxidación lipídica**, vemos que en función del aldehído cuantificado los potenciales de los 8 compuestos presentan, en general, grados de actividad diferentes. La excepción de nuevo es el **hidroxitirosol**, que en los tres test muestra el máximo poder antioxidante. También se observa que tan solo 5 de los 8 fenoles seleccionados son capaces de disminuir de forma significativa la formación del aldehído **GSA**. Los dos secoiridoides (**3,4-DHPEA-EDA y p-HPEA-EDA**) y el **ácido gálico** no muestran ningún efecto. Sin embargo tan solo 2 de los 8 fenoles seleccionados **no presenta efecto inhibidor** significativo sobre la formación de **AASA y MDAL**, estos son el **3,4-DHPEA-EDA y la luteolina** respectivamente. Cabe destacar la **correlación** clara existente entre el aldehído **MDAL** y el **índice de peroxidabilidad** calculado tras el estudio de pérdida de ácido grasos poliinsaturados por acción de las LDL oxidadas. También existe

dicha **correlación** entre la aparición del aldehído **GSA** y la **viabilidad de las células endoteliales** estudiadas.

Cuando es la **fracción proteica** la diana de la oxidación, es importante resaltar el hecho de que 4 del total de compuestos fenólicos estudiados presentan **efecto prooxidante**. Estos compuestos son el **tirosol**, la **oleuropeína**, la **apigenina** y **su forma glucosilada**. Tan solo el **ácido ferúlico** tenía la misma acción sobre la **fracción lipídica** en la 1ª etapa de peroxidación. Vemos que la **oleuropeína** prooxidante para la fracción proteica, resulta ser el 4º agente antioxidante más potente para la 1ª etapa de oxidación lipídica. El **ácido gálico**, sin efecto antioxidante frente a la oxidación lipídica es el 2º con mayor poder antioxidante en la oxidación proteica. La **rutina** y el **pinoresinol** son las otras diferencias importantes (**ver tabla D1**). Los flavonoides son muy eficaces inhibiendo la peroxidación lipídica en su primera etapa de desarrollo, mostrando por el contrario una capacidad muy débil para prevenir la oxidación de la apoproteína de la LDL. En el caso de la rutina existen estudios que concuerdan con estos resultados. [39] Filipe et al (2002) estudió la capacidad de ciertos compuestos fenólicos para proteger frente al daño selectivo de la apolipoproteína B100 de las LDL. Se observó que dicha eficacia dependía de la capacidad de unión del compuesto a la LDL. La rutina al no ser capaz de unirse, era incapaz de reducir el daño oxidativo. El lignano se comporta de manera opuesta, siendo el tercer compuesto con mayor capacidad antioxidante en los estudios con la fracción proteica y tan solo el duodécimo en el screening con el test de Dienes conjugados.

Podemos observar que en los **test celulares** de los 8 compuestos estudiados, tan solo el hidroxitirosol, la luteolina y el ácido cafeico en el caso de las células endoteliales y la luteína, el *p*-HPEA-EDA, el hidroxitirosol y el 3,4- DHPEA-EDA en las células hepáticas, mostraban un efecto protector frente a la muerte celular. Se debe tener en cuenta que la selección de estos 8 compuestos de los 20 estudiados en un principio se realizó en base a su capacidad protectora frente a la oxidación de la fracción proteica. Esta baja eficacia de la mayoría de los compuestos podría deberse a que los mecanismos de acción para evitar oxidación proteica no son los mismos que para evitar la pérdida de viabilidad celular. Al mismo tiempo se observa la diferencia de resultados en función de la célula que se quiere proteger. Las **particularidades específicas de cada una de las líneas celulares** (más complejas que las lipoproteínas) podrían explicar las **diferencias de potencial antioxidante** de los compuestos fenólicos estudiados.

Por último, destacar los resultados del **estudio de sinergismo**. Se ha comprobado en este trabajo que la actividad antioxidante es mayor cuando se combina la actividad de diferentes compuestos fenólicos. Por tanto, a pesar de aparecer en pequeñas cantidades en el aceite y tener que superar los procesos de digestión posiblemente la combinación de estos permita que su efecto se pueda potenciar. En la **tabla D 3** se resumen los resultados obtenidos. Se puede ver como el poder antioxidante es de 1.3 a 1.9 veces más potente cuando se combinan los compuestos fenólicos que cuando actúan de forma independiente, encontrándose diferencias significativas para todos los casos.

En todos los casos es importante tener en cuenta que los **compuestos fenólicos** estudiados presentan **diferentes grados de polaridad** que les hacen ser más liposolubles o hidrosolubles. Según este factor tendrá mayor o menor facilidad de proteger la fracción

proteica o lipídica de la LDL así como la unidad celular. Este puede ser otro factor clave para explicar los diferentes grados de capacidad antioxidante de cada compuesto según la metodología empleada.

Con estos estudios se contribuye a demostrar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en relación con la prevención o reducción de la oxidación de las LDL, y por tanto es posible contribuir a disminuir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Se puede afirmar que el consumo de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos puede disminuir la susceptibilidad a la oxidación de la LDL, que bajo esta forma oxidada se considera un marcador biológico de estrés oxidativo.

Por lo tanto, una dieta cuya principal fuente de grasa sea el aceite de oliva, puede ser una herramienta útil contra los factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y otras patologías.

**Tabla D 3** Prolongación de la etapa de latencia de las LDL después de incubarse junto con 2  $\mu$ M de los diferentes compuestos fenólicos de manera individual y en las diferentes combinaciones entre ellos: Valores observados y valores esperados para las diferentes combinaciones.

Compuesto fenólico	Etapa de latencia hasta la detección de dienos conjugados (min $\pm$ desviación estándar)	Fase de latencia esperada hasta la detección de dienos conjugados (min $\pm$ desviación estándar)
"L"; luteolina	41.00 $\pm$ 15.23	
"D"; 3,4- DHPEA-EDA	21.56 $\pm$ 11.75	
"R"; rutina	21.44 $\pm$ 5.06	
"O"; oleuropeina	17.56 $\pm$ 13.64	
"H"; hidroxitirosol	13.87 $\pm$ 11.83	
H,L,O,R,D	207.46 $\pm$ 19.48	<b>115.43 (1.8)</b>
H,L,O,R	183.94 $\pm$ 22.05	<b>93.87 (1.9)</b>
L,O,R,D	150.41 $\pm$ 14.09	<b>101.56 (1.5)</b>
H,L,R,D	139.18 $\pm$ 6.57	<b>97.87 (1.4)</b>
H,O,R,D	133.22 $\pm$ 16.85	<b>74.43 (1.8)</b>

H,L,O,D	123.20±14.09	93.99 (1.3)
---------	--------------	-------------

Min: minutos

### CAPITULO III: Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva.

Esta demostrado que el consumo de aceite de oliva virgen mejora la estabilidad oxidativa del plasma, y en especial la resistencia a la oxidación de las LDL, en base a su elevado contenido de ácidos grasos monoinsaturados y antioxidantes (tocoferol o vitamina E, carotenoides y compuestos fenólicos) [40-47].

Durante los últimos años son numerosos los estudios que han demostrado el papel de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen en la mejora de diferentes marcadores de stress oxidativo. Los primeros estudios llevados a cabo con algunos compuestos de naturaleza antioxidante, como la vitamina E [48-50] y los carotenos [51,52] no demostraron un papel destacable en la mejora de la estabilidad oxidativa del plasma, por lo que los resultados de estos estudios no fueron muy alentadores para demostrar el poder saludable del aceite de oliva. Sin embargo, la falta de resultados podría estar relacionada con la forma de ingesta de la vitamina E y los carotenos. En estos estudios la ingesta de estos antioxidantes se llevaba a cabo en forma aislada, sin la presencia de otros antioxidantes como los compuestos fenólicos, y a dosis muy por encima de las dosis habituales de ingesta con aceite de oliva que podría dar lugar a una actividad pro-oxidante [4,48,51-53]. Por tanto, a la hora de establecer la función de los componentes antioxidantes del aceite de oliva es importante tener en cuenta las posibles sinergias y la influencia de la matriz alimentaria.

En relación con la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios en animales y humanos después de una dieta suplementada [18,43,54-66]. Estos estudios de biodisponibilidad se han centrado básicamente en la cuantificación de tirosol e hidroxitirosol y sus metabolitos en plasma, LDL y orina. El rango de biodisponibilidad observado varía entre el 15 y el 55% [67]. Sin embargo, estas bajas concentraciones plasmáticas parecen ser suficientes para ejercer su actividad biológica [68], bien en sus formas nativas o como formas conjugadas después de su paso por el sistema entero-hepático [69]. Se ha observado que aproximadamente un 98% de los fenoles detectados en plasma y orina, tras la ingesta moderada de aceite de oliva (25mL/día), aparecen conjugados, principalmente como glucurónidos [43,70].

Concretamente, los aspectos que requieren un mayor estudio se centran en determinar qué componentes de la fracción fenólica son más fácilmente absorbibles en el aparato digestivo, cómo pasan y en qué forma al torrente sanguíneo para dirigirse a los tejidos y compartimentos celulares diana; y demostrar también que sus metabolitos, a las concentraciones biodisponibles resulten beneficiosos. Existen estudios que muestran capacidades antioxidantes superiores en el metabolito que en la forma nativa del fenol, tal es el caso de los resultados obtenidos por [65] Tuck y col. (2002), que demostraron una mayor eficacia de la forma glucuronidada del hidroxitirosol, en relación con la forma nativa. Sin embargo, otro estudio llevado a cabo ese mismo año por [71] Boersma y col. (2002) determinó que durante el metabolismo de fase II en los enterocitos, la enzima glucuronosil-transferasa conjugaba la forma nativa de los flavonoides, en la región de la molécula mas determinante para su capacidad antioxidante, disminuyendo probablemente su potencial protector.



El principal problema que surge a la hora de abordar los estudios de biodisponibilidad de los fenoles del aceite de oliva es el escaso conocimiento de los metabolitos en que se transforman. Todavía hoy los estudios *in vivo* publicados se centran principalmente en la biodisponibilidad del hidroxitirosol y el tirosol, mientras que la información de otros compuestos como los lignanos o los flavonoides, en la matriz aceite de oliva virgen, es prácticamente nula. Algunos estudios han abordado las agliconas de los secoiridoides de la oliva, concretamente de la oleuropeina, aunque finalmente estos estudios han acabado reduciéndose a un control de la biodisponibilidad del hidroxitirosol y sus metabolitos.

Una de las principales razones que pueden justificar la falta de estudios de biodisponibilidad de compuestos fenólicos radica en la complejidad de los métodos de análisis, que requiere sistemas de identificación y cuantificación muy selectivos, dada la baja concentración de estas moléculas en los fluidos biológicos, además de su intenso metabolismo que no permite disponer de patrones para una correcta identificación. Por tanto, en una primera etapa se procedió a la puesta a punto y validación de la metodología de análisis de compuestos fenólicos y sus metabolitos en plasma humano (**Capítulo III: 9.3**).

El principal reto al inicio de esta parte del trabajo estuvo en la no disponibilidad de patrones comerciales de los metabolitos de los fenoles del aceite de oliva. Por tanto, durante la fase de desarrollo y validación del método cromatográfico se trabajó con patrones comerciales correspondientes a tres compuestos fenólicos (hidroxitirosol, ácido cafeico y luteolina), representativos de las subfamilias de fenoles que conforman el perfil fenólico del aceite de oliva. Una vez seleccionados los patrones, como matriz de enriquecimiento para el cálculo de los parámetros de validación se utilizó un pool de plasma humano obtenido en condiciones de ayuno que, previamente a la aplicación de los patrones, se pasaba por una fase sólida con el objetivo de eliminar los fenoles endógenos y obtener así un plasma “desfenolizado”.

Una vez validado el método de análisis de compuestos fenólicos en plasma, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem, se aplicó a dos tipos de muestras: plasma humano en condiciones de ayuno y post-prandial obtenido tras la ingesta de 40 mL de aceite de oliva virgen, y medio celular procedente del modelo de metabolismo con línea celular Caco-2/TC7.

Tras la puesta a punto de la técnica analítica, se llevó a cabo un estudio de evaluación de la digestibilidad y metabolismo en modelos *in vitro*, cuyos resultados se han presentado en el **Capítulo III:9.1 y 9.2**.

Los estudios de biodisponibilidad de fitoquímicos en animales de experimentación y humanos son complejos, con un elevado coste económico y largos. En este sentido, los modelos de digestión *in vitro* permiten evaluar de forma simple la estabilidad durante las diferentes etapas de digestión en las que las moléculas se ven sometidas a diferentes condiciones de pH y actividades enzimáticas. Además, los modelos de digestión *in vitro* permiten llevar a cabo numerosos ensayos necesarios cuando se pretende evaluar el efecto de la composición de la matriz alimentaria sobre la estabilidad y digestibilidad de los compuestos fenólicos, especialmente importante a la hora de formular alimentos o de

establecer la biodisponibilidad real de los componentes fenólicos de un determinado alimento. Una vez evaluada la digestibilidad, la combinación con un modelo celular facilita los estudios de absorción y metabolismo intestinal. Por tanto, la combinación de ambos modelos ha permitido determinar la relación entre las diferentes estructuras fenólicas con su estabilidad gastrointestinal y su metabolismo y transporte entérico.

El estudio de digestibilidad y estabilidad de los fenoles durante la digestión, tuvo una primera fase de puesta a punto del modelo en el que se seleccionaron las condiciones óptimas de digestión en sus tres fases: boca, estómago e intestino delgado. Como matriz de digestión para la puesta a punto del método se utilizó aceite de oliva refinado enriquecido con los fenoles mayoritarios del aceite de oliva virgen. Con el estudio *in vitro* se pretendió elucidar la tendencia que tendrían los fenoles a liberarse de la matriz aceite (matriz alimentaria), y ser transferidos a la fase acuosa de la digestión (fracción digerida o bioaccesible) en la que estarán disponibles para su posterior absorción gástrica e intestinal. Un estudio previo llevado a cabo por [72] Dinella (2007) determinó que los fenoles del aceite de oliva eran prácticamente transferidos en su totalidad a la fracción acuosa tras la digestión *in vitro*. Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, sin embargo se debe indicar que la polaridad de la estructura fenólica influye en su distribución entre la fase acuosa y fase oleosa [58]. Los compuestos más polares, como los fenoles simples y los secoiridoides, se han cuantificado mayoritariamente en la fase acuosa; sin embargo los más apolares, como los lignanos y los flavonoides, son retenidos en mayor medida en la matriz oleosa no digerida.

A este nivel, hay que tener también en cuenta, que la fase que determina la bioaccesibilidad, la fase acuosa, puede presentar estructuras micelares. Los fenoles podrían aparecer dentro de estas micelas por lo que no estarían realmente disueltos en la fase acuosa. Hasta el momento no se sabe si esta relación favorece o limita la absorción. Existen estudios que intentan elucidar el efecto de estas micelas sobre los polifenoles del té, en concreto el efecto del tamaño de las gotas de grasa dentro de la fase acuosa [73].

Además de la transferencia de los fenoles desde la matriz aceite a la fase acuosa o digesta, es necesario conocer de qué forma afectan las condiciones fisiológicas de la digestión sobre su estabilidad. Durante la digestión gástrica e intestinal se suceden una serie de cambios importantes del pH, así como la secreción de enzimas y sales biliares. Los resultados de nuestro estudio han permitido observar cómo los principales compuestos fenólicos del aceite: hidroxitirosol, tirosol, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y ácido elenólico, se mantienen bastante estables bajo las condiciones del estómago, donde destaca la acidez del medio (Tabla D.4). Los fenoles del aceite provienen de formas glucosiladas presentes en la oliva. Durante el proceso de obtención del aceite, estas estructuras se ven sometidas a condiciones ácidas y a la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, que libera el glucósido apareciendo las formas agliconas. Esto podría explicar que estas estructuras agliconas, producto de un medio ácido, se muestren bastante estables en las condiciones de baja acidez a las que están sometidas durante la etapa de digestión gástrica. No obstante, en esta etapa comienza la hidrólisis de los secoiridoides (3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA) que resulta en la disminución de estos y el aumento de los fenoles simples y el ácido elenólico en la mezcla de digestión. La estabilidad del hidroxitirosol y el tirosol en esta etapa y el hecho de ser transferido mayoritariamente a la fase acuosa podría explicar

porqué se detectan tan rápidamente en el plasma, tanto en sus formas nativas como metiladas, tras solo 60 minutos después de la ingesta de aceite de oliva virgen [74].

Sin embargo durante la digestión en el intestino delgado la inestabilidad de las estructuras fenólicas aumenta. Tan solo un 10% de los secoiridoides, así como del ácido elenólico se detectan en la fase acuosa tras esta etapa de digestión, aumentando de forma paralela la cantidad de hidroxitirosol y tirosol. De forma similar, se observa una disminución de los flavonoides en la fase oleosa o fracción no digerida. En estudios anteriores [58,75] ya se establecieron hipótesis basadas en una primera hidrólisis de las formas agliconas de la oleuropeína y del ligustrosido, que daba lugar a la liberación de hidroxitirosol y tirosol. Otros estudios observaron los mismos efectos de la digestión. [59] Corona y col (2006) comprobaron que el tirosol y el hidroxitirosol se transportan por difusión pasiva y que una parte importante de la molécula de oleuropeína se hidroliza en las condiciones gástricas simuladas, aumentando la disponibilidad de hidroxitirosol y consecuentemente aumentando la cantidad de fenol que puede ser transportado por difusión pasiva.

Otros estudios también han demostrado cómo el pH del tracto intestinal o la acción de los diferentes enzimas digestivos dan lugar a la hidrólisis de determinados compuestos fenólicos del aceite de oliva. Así la oleuropeína y el ligustrosido y sus derivados son hidrolizados rápidamente a hidroxitirosol y tirosol, forma en la que son finalmente absorbidos en el intestino. Este hecho puede explicar que la mayor parte de los fenoles cuantificados en plasma y LDL después de la ingesta de aceite de oliva corresponden a las formas conjugadas de estos dos compuestos fenólicos, así como a sus derivados entre los que destaca el ácido homovainílico [18,54,59-61,64]. Por tanto, este intenso metabolismo de los fenoles del aceite de oliva justifica la complejidad del estudio de su biodisponibilidad, a diferencia por ejemplo de los flavonoides que en su mayor parte aparecen en sus formas conjugadas (metiladas, sulfatadas y glucuronidadas) sin haber sufrido una hidrólisis previa de la forma nativa durante el proceso de digestión gastrointestinal. Hecho que facilita su identificación y cuantificación en muestras complejas, como es el caso del plasma.

Es interesante destacar el comportamiento de los lignanos. Estos se mantienen bastante estables durante el proceso completo de digestión *in vitro* e incluso se puede observar una mayor concentración en la mezcla de digestión después de la etapa duodenal, que podría ser resultado de la hidrólisis de estructuras más complejas presentes en el aceite de oliva y no caracterizadas hasta el momento. Existen estudios que indican que son las formas metabólicas de los lignanos, producidos por la microflora intestinal, las que son absorbidas y detectadas finalmente en plasma [76].

Se puede concluir que el hidroxitirosol y el tirosol son los compuestos fenólicos que se encuentran en mayor concentración en la mezcla de digestión tras las etapas gástrica y duodenal, a pesar de no ser los mayoritarios en la matriz originaria sometida a digestión (aceite de oliva). Lo que podría justificar su mayor bioaccesibilidad, en relación con otros componentes de la fracción fenólica, y que puedan ser utilizados con marcadores de consumo de aceite de oliva virgen. Probablemente los secoiridoides actuarán como fuente de estas estructuras, asegurando la llegada en cantidades importantes de estos fenoles más simples a las zonas de absorción. Aunque los otros compuestos caracterizados también

son potencialmente absorbibles por los enterocitos, se puede ver un gran rango de concentraciones diversas en función de la molécula fenólica (Tabla D.4). Conclusiones similares alcanzaron con su estudio [72]. Dinella y col. (2007), calcularon índices de bioaccesibilidad de los fenoles que oscilaban entre el 37 y el 90%.

**Tabla D 4.** Resumen de los resultados de la digestión *in vitro* del aceite de oliva. Los balances positivos indican “generación” durante la digestión.

	Digestión gástrica			Digestión duodenal				Total	Aceite de oliva	balance
	Fracción grasa (nmols/g)	Fracción acuosa (nmols/g)	Fracción grasa (nmols/g)	Fracción acuosa (nmols/g)	Digestión gástrica (nmols/g)	Digestión duodenal (nmols/g)	Total (nmols/g)			
<b>Fenol</b>										
<b>Hidroxitirosol</b>	2.88	32.8	0.64	26.1	35.68	26.74	62.42	19.9	<b>42.52</b>	
<b>Tirosol</b>	3.68	27.9	4.16	48.6	31.58	52.76	84.34	15.3	<b>69.04</b>	
<b>p-cuuarico</b>	0.44	0.25	0	0	0.69	0	0.69	0.85	<b>-0.16</b>	
<b>Ácido elenólico</b>	59.3	194	0.61	2.43	253.3	3.04	256.34	207	<b>49.34</b>	
<b>3,4-DHPEA-EDA</b>	22.2	236	0	1.72	258.2	1.72	259.92	384	<b>-124.08</b>	
<b>p-HPEA-EDA</b>	9.85	21.7	0	0	31.55	0	31.55	39.4	<b>-7.85</b>	
<b>Pinoresinol</b>	12.1	0	9.64	0	12.1	9.64	21.74	4.62	<b>17.12</b>	
<b>(+)-1-Acetoxyipinoresinol</b>	17.8	22.8	26.9	24.08	40.6	50.98	91.58	28.9	<b>62.68</b>	
<b>Apigenina</b>	3.5	0	1.21	0	3.5	1.21	4.71	3.59	<b>1.12</b>	
<b>Luteolina</b>	10	0.36	0.6	3.67	10.36	4.27	14.63	11.5	<b>3.13</b>	
<b>Total</b>	<b>141.75</b>	<b>535.81</b>	<b>43.76</b>	<b>106.6</b>	<b>677.56</b>	<b>150.36</b>	<b>827.92</b>	<b>715.06</b>	<b>112.86</b>	

Una vez evaluada la transferencia de los diferentes fenoles desde el aceite (matriz de digestión) hacia la fracción acuosa o digesta durante el proceso de digestión gastrointestinal, la siguiente etapa del estudio se centró en la evaluación del metabolismo y transporte trans-epitelial de los fenoles a través de la barrera del epitelio intestinal. Conocer cual es el grado de absorción (bioaccesibilidad) y el tipo de metabolismo de los compuestos fenólicos del aceite de oliva a nivel de intestino se considera requisito indispensable para establecer una relación causal, entre los compuestos fenólicos presentes en el aceite y sus efectos biológicos asociados con la prevención de enfermedades.

Para conseguir este objetivo, por un lado se seleccionaron los fenoles más representativos de los subgrupos que forman el conjunto del perfil fenólico del aceite de oliva y que habían mostrado capacidades antioxidantes de interés en la primera parte del estudio (Capítulos II). Además de haber sido cuantificados en el digerido (fase acuosa) después del proceso de digestión-gastrointestinal. Como modelo se empleó una metodología para simular *in vitro* el proceso de absorción y metabolismo a través de los enterocitos de la membrana en cepillo del intestino delgado, con el uso de cultivos celulares de Caco-2/TC7 y placas transwell. Los modelos de Caco-2 han sido reconocidos por la administración americana (FDA) para la determinación *in vitro* de la permeabilidad y las características de transporte de un fármaco a través de la mucosa intestinal. Actualmente estos modelos celulares son muy empleados para este tipo de estudios.

Cuando se planteó este estudio, se desconocía la concentración que alcanzarían los fenoles en la mezcla de digestión y que estarían en contacto con los enterocitos para su posterior metabolismo y transporte. En base a los resultados obtenidos tras la digestión *in vitro* y teniendo en cuenta tanto la fase acuosa como la oleosa, los compuestos fenólicos podrían alcanzar las áreas de absorción en rangos de concentración entre 5 y 20  $\mu\text{M}$ , con una ingesta diaria de aproximadamente 25 g de aceite. Sin embargo, los datos de que se disponía a través de la literatura científica mostraban que las concentraciones empleadas con estos modelos iban desde 500  $\mu\text{M}$  [57], hasta 10  $\mu\text{M}$  [77]. Por tanto, se decidió comenzar con una concentración en el medio celular de 40  $\mu\text{M}$ , e ir aumentándolo hasta 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  con el objetivo de elucidar todas las posibilidades de metabolismo a nivel del epitelio intestinal. El tiempo de incubación también se fue alargando de 1 a 24 horas para alcanzar el mismo objetivo.

En una **primera etapa se estudio el metabolismo celular** sobre los distintos compuestos fenólicos escogidos. En el año 2005, Mateos y col.[78] realizaron un estudio en células HepG2 para caracterizar el metabolismo del hidroxitirosol, tirosol e hidroxitirosol acetato en el hígado. La detección de diferentes metabolitos fue clara, siendo principalmente formas glucuronidadas y sulfatadas, que coincidían con las formas mayoritarias detectadas en plasma. Los resultados obtenidos sugerían que el metabolismo de fase II del los fenoles del aceite de oliva tenía lugar principalmente en el hígado. Esta afirmación la realizaban al comparar sus resultados con los estudios de metabolismo en epitelio intestinal tanto en modelos Caco-2 [57], como en segmentos de intestino perfusionado [54].

En el primer caso, [57] Manna y col., (2000) observaron, que una parte del hidroxitirosol se puede absorber en el intestino por difusión pasiva, mientras que otra experimenta una serie de conjugaciones. Encontraron que el 90% del hidroxitirosol y sus metabolitos (en

este caso solo detectaron alcohol homovanílico) eran secretados en orina y un 5% se recuperaba en las heces. Posteriormente, otros autores han confirmado la presencia de este metabolito [59,61,79-83]. Los resultados más recientes del proyecto EUROLIVE han corroborado el elevado grado de conjugación que sufren las formas nativas, en intestino e hígado, apareciendo los metabolitos como las formas predominantes en plasma y orina en estudios postprandiales [45].

A través de un estudio llevado a cabo con individuos ileostomizados a los que se suministró un extracto de aceite de oliva rico en agliconas de la oleuropeína y el ligustrósido, un extracto polar rico en hidroxitirosol y tirosol, y un tercer suplemento consistente en oleuropeína en su forma natural glucosilada, Vissers y col. (2002) [54] propusieron una posible ruta metabólica (Figura D 10). Los resultados del análisis de orina sugieren que las formas agliconas son transformados antes de ser absorbidos y que el hidroxitirosol y el tirosol son glucuronidados en los enterocitos y en el hígado. Paralelamente la metilación se daría exclusivamente a nivel hepático.

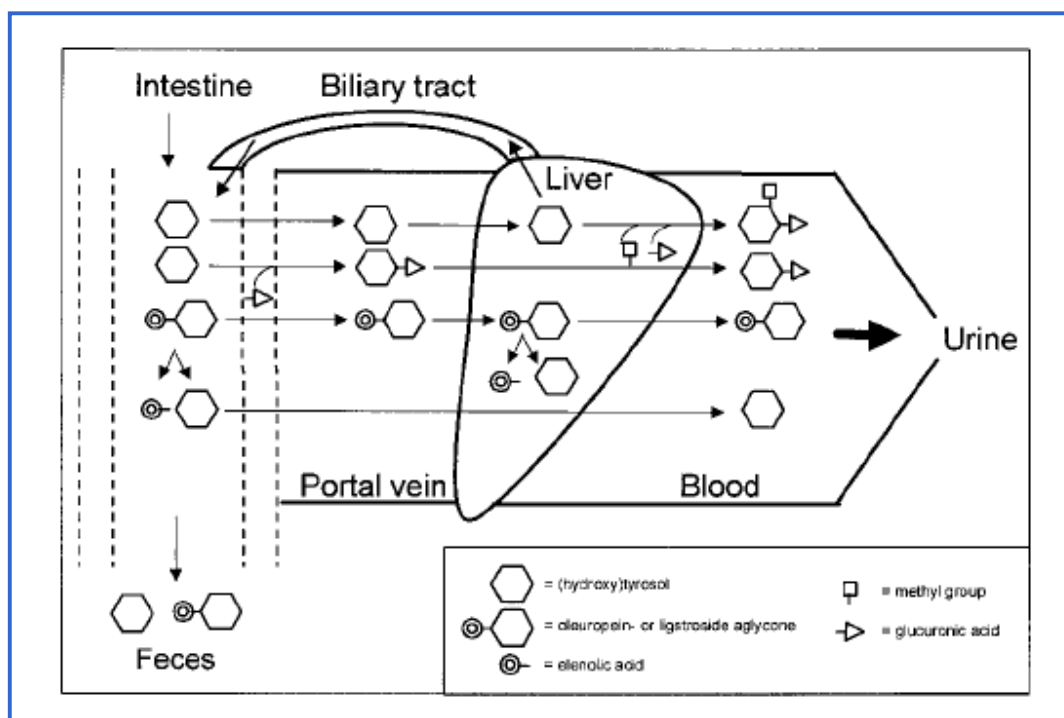


Figura D 10. Esquema del posible metabolismo de fenoles del aceite de oliva (Fuente: [54]).

En estudios posteriores, realizados por [59] Corona y col. (2006) cuando estudiaban la digestibilidad de la oleuropeína, su absorción, metabolismo y transformaciones en la microflora del colon, se hicieron unos ensayos de transporte de tirosol e hidroxitirosol en células Caco-2 y en segmentos de intestino de rata. Los resultados les llevaron a advertir sobre la extrapolación de los ensayos con células y animales a las condiciones *in vivo* en humanos. En los ensayos con fragmentos de intestino detectaron como principales metabolitos los derivados *O*-metilados del hidroxitirosol (alcohol homovanílico) y las formas glucuronidadas del tirosol e hidroxitirosol; sin embargo, en el ensayo con células Caco-2 no se detectaron los derivados glucuronidos, pero sí un conjugado del hidroxitirosol con glutatión. En ninguno de los ensayos en modelo Caco-2 detectaron otros metabolitos que si habían sido detectados en orina de rata, como el ácido homovanílico, 3-hidroxi-4-metoxifenilacético, 2,(3,4-dimetoxifeniletanol) y metabolitos sulfatados, por lo que los autores sugieren que estos metabolitos probablemente se formen en el hígado.

Sin embargo los resultados de nuestro trabajo con la línea celular Caco-2/TC7 no han mostrado un metabolismo muy intenso, desde el punto de vista cuantitativo, pero sí aparecen diversas formas conjugadas, algunas de ellas en muy baja concentración. Teniendo en cuenta los moles iniciales de cada fenol en el medio celular antes de la incubación y los diferentes metabolitos cuantificados en el medio después de la incubación en presencia de la línea celular, el rendimiento del metabolismo ha variado entre el 11%

para el ácido *p*-cumárico hasta el 52% para la luteolina, siendo en la mayoría de los casos el rendimiento directamente proporcional a los periodos de incubación. Una revisión llevada a cabo por [58] Vissers y col. (2004) sobre la biodisponibilidad de los fenoles de aceite de oliva en humanos ha mostrado porcentajes de absorción entre el 55 y el 66%, y numerosos estudios hablan de una absorción directamente proporcional a la dosis consumida [18,61,62,80]. Por tanto, el bajo rendimiento del metabolismo en el modelo celular empleado en nuestro estudio podría responder al hecho de que se ha trabajado con los compuestos de forma aislada y no en la matriz del aceite de oliva, como corresponde a los ensayos de ingesta en humanos. En este sentido, diferentes autores afirman que la absorción de estos fenoles se ve favorecida cuando están dentro de la matriz de aceite de oliva [60,65]. Esto podría confirmar la buena estabilidad de algunos fenoles observada en nuestro estudio durante la digestión *in vitro*, al estar incluidos en la matriz de aceite de oliva; y por otro lado su bajo rendimiento de metabolismo en el modelo celular en el que se ha trabajado con los compuestos disueltos directamente en el tampón, omitiendo así el potencial efecto protector del aceite de oliva. Se debe tener en cuenta que se produce una pérdida del compuesto fenólico durante el periodo de incubación por efecto del tiempo y de la temperatura que probablemente favorecen la degradación oxidativa. Esto explicaría porqué el total de las formas nativas y sus metabolitos, tanto en el medio celular como en el interior de las células, en algunos compuestos fenólicos son sensiblemente inferiores con la concentración inicial en el medio.

A nivel cualitativo, los resultados son destacables. En nuestro estudio se analizaron los metabolitos presentes tanto en el interior de las células como en el medio de cultivo. La presencia de metabolitos en el medio puede ser consecuencia de dos mecanismos: (i) la célula metaboliza los compuestos fenólicos en su interior y luego los excreta al medio o (ii) excreta los enzimas responsables del metabolismo de fase II al medio y es en éste donde tienen lugar las conjugaciones. La detección de algunos metabolitos (formas glucuronidadas, sulfatadas y metiladas) en el interior de las células permite afirmar que los tres enzimas propios del metabolismo de fase II están presentes y activos en estas células. Los metabolitos que se identificaron de forma global, tanto en el interior de la célula como en el medio apical y basolateral, se recogen en la **Tabla D 5**.



**Tabla D 5.** Metabolitos identificados después del periodo de incubación.

Forma nativa	Forma conjugada
<b>Hidroxitirosol</b>	<b>Hidroxitirosol sulfato</b>
	<b>Hidroxitirosol metil-sulfato</b>
	<b>Hidroxitirosol metil (Alcohol homovanillico)</b>
<b>Tirosol</b>	<b>Tirosol metil</b>
	<b>Tirosol sulfato</b>
<b>Acido cumarico</b>	<b>Acido cumarico disulfato</b>
	<b>Acido cumarico metil</b>
<b>Pinoresinol</b>	<b>Pinoresinol sulfato</b>
	<b>Pinoresinol glucuronido</b>
<b>Luteolina</b>	<b>Luteolina glucuronida</b>
	<b>Luteolina metil</b>
	<b>Luteolina metil-glucuronido</b>

El potencial metabólico de un compuesto fenólico depende de los diferentes lugares donde sea posible realizarse la conjugación y generalmente va directamente relacionado con los grupos -OH que posea la molécula. Por orden de mayor a menor número de grupos hidroxilo, los fenoles ensayados van desde la luteolina>hidroxitirosol>pinoresinol= acido *p*-cumarico= tirosol. Este orden coincide con el grado de metabolismo observado en nuestro estudio con células Caco2/TC7. Destacar que, de los tres últimos compuestos con el mismo numero de grupos -OH, el pinoresinol tiene todos los grupos hidroxilo unidos al anillo aromático a diferencia del acido *p*-cumárico y la luteolina, y es en proporción el que mas se metaboliza de los tres.

Si se comparan estos resultados con estudios mencionados anteriormente, se pueden observar diferencias destacables. De forma global, la metilación es la conjugación más abundante, y las formas sulfatadas se han detectado para todos los compuestos fenólicos estudiados, excepto en el caso de la luteolina. Esto podría contradecir los estudios anteriores que indicaban que este tipo de conjugación es más propia del metabolismo hepático. De forma particular, señalar que en el caso del hidroxitirosol además de detectarse la forma metilada, como ya lo habían hecho otros autores citados anteriormente, también se identificó el hidroxitirosol sulfato y el hidroxitirosol metilsulfato, con un rendimiento en el metabolismo dependiente del tiempo de incubación. Sin embargo no se detectó la forma glutation, identificado como metabolito de este fenol por [59] Corona y col. (2006). En el caso del tirosol tan solo se detectaron formas conjugadas tras 24 horas de incubación, en sus formas metil y sulfato. No se detectaron formas glucuronido con este compuesto a diferencia de lo observado por [59] Corona y col. (2006).

En el ácido *p*-cumárico, el grado de metabolismo también fue muy bajo, en este caso el factor concentración permitió la formación de las formas conjugadas. Se necesitaron concentraciones de 100  $\mu$ M para detectar ácido cumárico disulfato y metil cumárico. Sin embargo, estudios realizados por [84] Kern y col. (2003), centrados en la caracterización del metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos, con la utilización de un modelo celular

similar, determinaron para el ácido *p*-cumárico las formas metabólicas metilsulfato, sulfato y un posible metilglucuronido.

El bajo nivel de metabolismo, tanto del tirosol como del ácido *p*-cumárico, contrasta con el rápido y eficaz metabolismo detectado para los flavonoles en los estudios realizados con el mismo modelo celular Caco-2/TC7 por [85] Barringto y col. (2009).

A diferencia de los fenoles simples, ácidos fenólicos y flavonoides, existen muy pocos estudios de metabolismo de lignanos en modelo celular. Los resultados de nuestro estudio han mostrado que el metabolismo del pinoresinol es proporcional al tiempo de incubación, dando lugar a la formación de formas sulfatadas y glucuronidadas. Finalmente, la luteolina ha sido el compuesto fenólico que ha mostrado una mayor velocidad de metabolismo, también dependiente del tiempo de incubación. Destaca la forma metilada como la mayoritaria en los tres tiempos de incubación ensayados, habiéndose detectado la forma glucuronidada y metilglucuronidada tras 6 horas de incubación. [77] Murota y col. (2002) y [86] Siu Pong y col. (2005) detectaron también la forma glucuronidada en modelo de células Caco-2, y en el caso del segundo estudio se identificaron además formas sulfatadas. [71] Boersma y col. (2002) comprobaron que la glucuronidación en microsomas de intestino humano es marcadamente más elevada que en microsomas de hígado humano.

Las diferencias encontradas entre los resultados de nuestro estudio y estudios previos llevados a cabo por otros autores pueden ser consecuencia de las diferentes condiciones de trabajo y a las líneas celulares utilizadas en el modelo.

Una vez determinado la intensidad y el tipo de metabolismo de los diferentes compuestos fenólicos, la segunda fase de este estudio se centró en la evaluación del transporte de las formas nativas de los fenoles y sus metabolitos a través de la monocapa de células Caco-2/TC7 simulando el transporte a través del epitelio intestinal. Entender cómo influyen los fenómenos de conjugación de la molécula fenólica en el flujo de su transporte a través del enterocito, es fundamental para establecer el mecanismo de absorción de los fenoles del aceite de oliva. En este caso, se decidió trabajar con concentraciones de 100  $\mu$ M pues era la concentración con la que más actividad metabólica se observaba, y se establecieron periodos de 1, 6 y 24 horas de incubación. En la Figura D.11 se representa el flujo de los distintos metabolitos a lo largo del tiempo en las diferentes áreas: apical, células y basolateral. Los resultados se presentan de forma semicuantitativa, pues las cantidades detectadas eran tan pequeñas que cuantificarlas con el método desarrollado introduciría un importante error.

De forma general se puede observar como tanto las formas nativas como sus metabolitos terminan detectándose en la zona basolateral a mayor tiempo de incubación. Esto es indicativo de que son absorbidas, a excepción de la forma metilglucuronidada de la luteolina que solo se detecta en la zona apical. Este hecho concuerda con lo observado por [87] Crespy (1999) y [88] Andlauer (2000), que indicaban que en la mayor parte de los flavonoides, una amplia proporción de los glucuronidos formados en la mucosa intestinal se secretaban de nuevo al lumen intestinal (zona apical en nuestro estudio) lo cual reducía la absorción de dichos compuestos.

En la 1ª hora, no se detectan prácticamente metabolitos en la zona basolateral, a excepción de los conjugados del pinosresinol y la metil luteolina. Con este modelo celular, el metabolismo del pinosresinol observado, es muy eficaz. Tras 24 horas de incubación tanto las formas nativas como sus metabolitos muestran una tendencia clara a desplazarse hacia la zona basolateral.

Tras una hora de incubación las formas nativas aparecen todas en la zona basolateral, a excepción del hidroxitirosol. Este compuesto fenólico muy característico del aceite de oliva, se absorbe por difusión pasiva al igual que el tirosol [57]. Este mecanismo de absorción no es común a todos los fenoles del aceite. Se cree que la oleuropeina atraviesa el epitelio a través de un transporte transcelular o por movimientos paracelulares [63].

El hidroxitirosol, no es detectado hasta las 6 horas de incubación. Sin embargo en el estudio de ingesta aguda se detecta hidroxitirosol en el periodo 0 min tras la ingesta (Capítulo II). En un estudio *in vivo* publicado por [54] Visser y col., (2002) se determinaron algunos metabolitos del hidroxitirosol en tratamientos control en los que no se había aportado aceite de oliva con la dieta, lo que en un primer momento les hizo atribuirlo a que el hidroxitirosol podría proceder de la ingestión de otros alimentos. Sin embargo, en otros trabajos la presencia de metabolitos del hidroxitirosol no ligada a la ingesta de aceite de oliva se ha atribuido a que existe una interacción entre los metabolitos del hidroxitirosol y los de la dopamina, siendo los originados a través de esta vía los que se detectarían en condiciones basales [61]. Se sabe que el hidroxitirosol es también un derivado endógeno del metabolismo de la dopamina, cuando el enzima oxidasa se ve catalizado por una desaminación y posteriormente por una reducción [81]. D'Angelo y col. (2001) [90] proponen una ruta metabólica para el hidroxitirosol que se muestra en la Figura D 11.

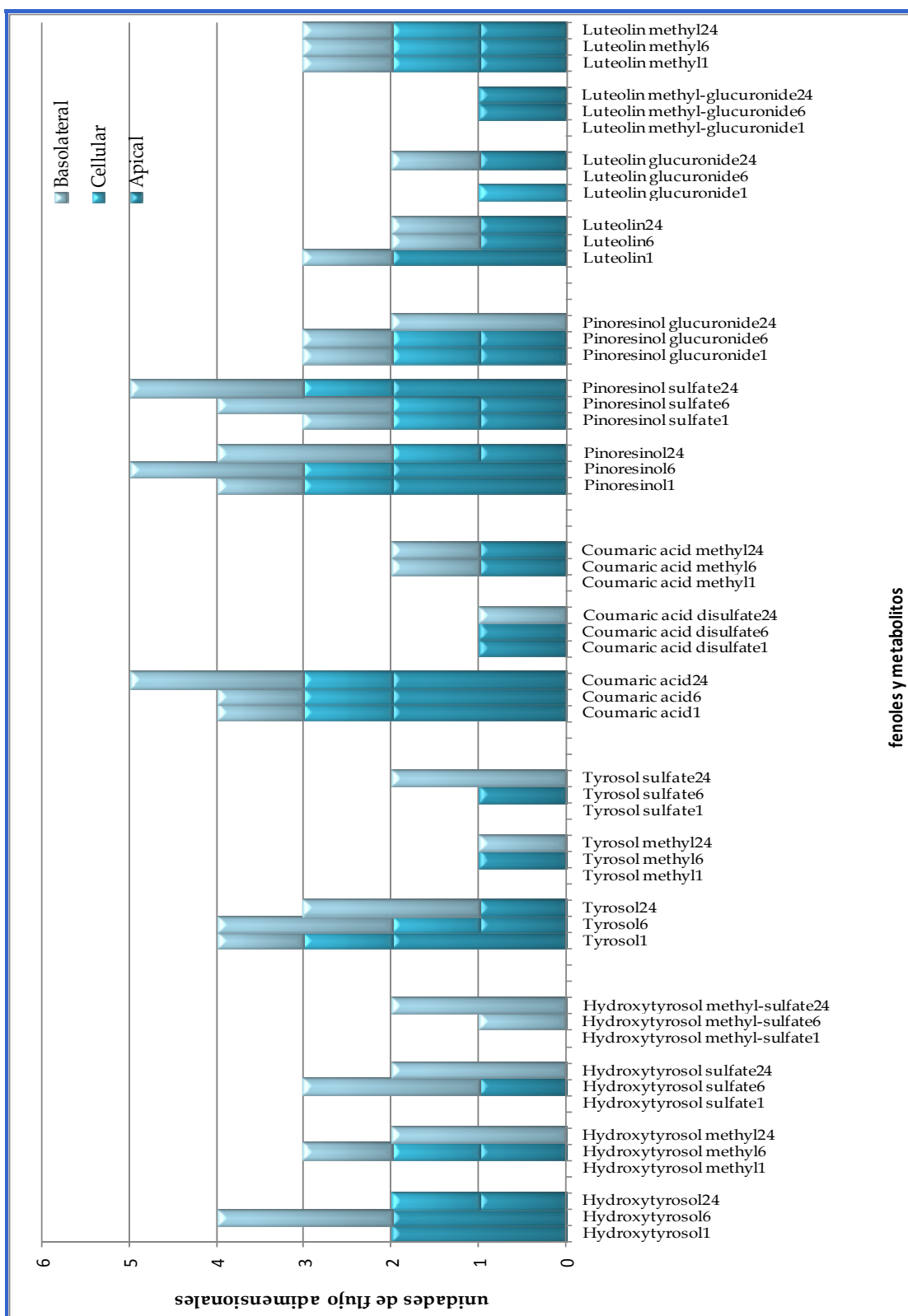


Figura D 11. 1 unidad de flujo = +; 2 unidades de flujo = ++; 0 unidades de flujo = -

Asimismo, no se detectó hidroxitirosol en el estudio de ingesta crónica (Capítulo III), pero si un gran numero de posibles derivados de la catecolamina pertenecientes a la ruta metabólica antes mencionada. Posiblemente en función de cada individuo y momento de la toma de muestra se detectarían diferentes estados de estas rutas metabólicas.

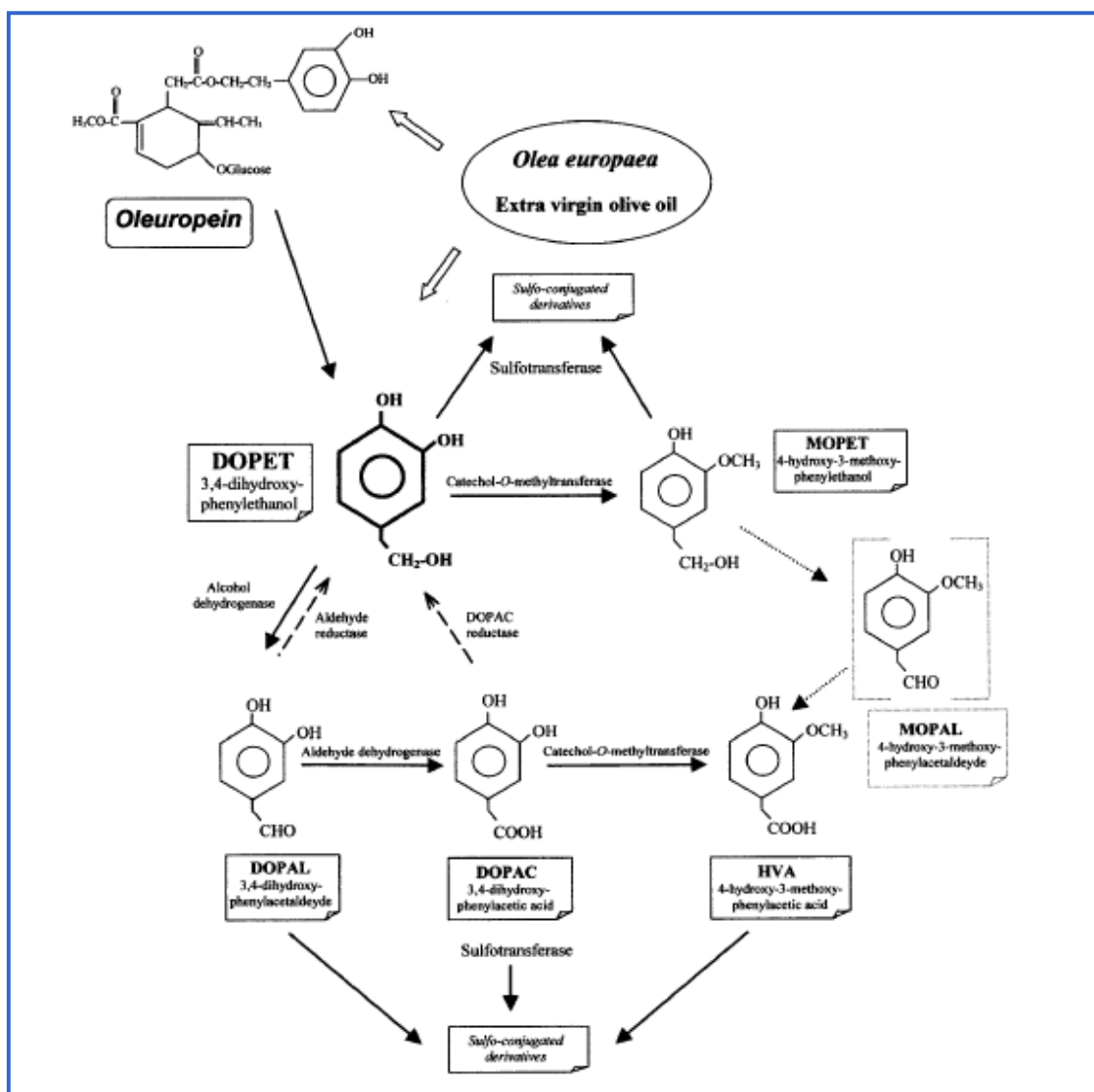


Figura D 12. Ruta metabólica del hidroxitirosol

Por último se llevaron a cabo dos estudios *in vivo* de intervención en humanos. El objetivo básico, del **Capítulo III: 9.3** y de un apartado del estudio recogido en el **Capítulo II** (estudio de ingesta aguda) fue la identificación de las formas nativas y los metabolitos de los polifenoles del aceite de oliva en plasma humano. En el primer estudio de ingesta aguda (**Capítulo II: 8.1**) se pretende demostrar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, algunos de los cuales todavía no se habían detectado en plasma, así como reforzar la teoría del efecto sinérgico de estos compuestos. Con el segundo estudio de ingesta crónica, se quería determinar si existían o no diferencias en el perfil fenólico entre consumidores habituales y no habituales de aceite de oliva. Estas diferencias podrían justificar el efecto positivo del consumo habitual de aceite de oliva sobre la salud.

El estudio de ingesta aguda se llevó a cabo con un grupo reducido de voluntarios que, tras una ingesta de 40 mL de aceite de oliva virgen, se procedió a la extracción de sangre a los 0, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la ingesta. En esta experiencia se pretendió establecer la presencia conjunta en plasma postprandial de compuestos fenólicos de las familias del hidroxitirosol y de los flavonoides que habían mostrado un efecto sinérgico de interés en la inhibición de la formación de dienos conjugados en el modelo de oxidación de LDL inducido con cobre (**Capítulo II: 8.1**). El análisis del perfil fenólico del plasma mostró la biodisponibilidad de una serie de compuestos fenólicos que a su vez habían mostrado un importante potencial antioxidante en los test de dienos conjugados. Dado que los test de capacidad antioxidante solo se realizaron con las formas nativas de los fenoles (**Capítulos I y II**), en este estudio de ingesta aguda el análisis cromatográfico de la composición fenólica del plasma estuvo orientado de forma especial a la identificación de las formas nativas de los fenoles. Pero la detección del 3,4-DHPEA-EDA en el plasma indica que no todos se hidrolizan en formas más simples y que pese a su mayor complejidad también son absorbidas. Los resultados han permitido establecer su presencia conjunta en plasma, alcanzando su concentración máxima a la hora para la luteolina, a las 2 horas para el 3,4-DHPEA-EDA y la oleuropeína aglicona, y a las 4 horas para el hidroxitirosol, después de la ingesta. En todos los casos las concentraciones máximas siempre han estado por debajo de una concentración de 2  $\mu\text{M}$ . Por tanto, la presencia conjunta de estos grupos fenólicos en plasma avala el interés del potencial efecto sinérgico observado entre los compuestos fenólicos que tienen el grupo hidroxitirosol en su molécula (secoiridoides) y los flavonoides, concretamente la luteolina observado en el modelo *in vitro* (Capítulo II). Esto podría explicar en parte la eficacia de los fenoles del aceite de oliva en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, pese a que las cantidades diarias ingeridas a través de esta fuente son muy bajas, en relación con otras fuentes de fenoles de la dieta, como es el caso de las frutas.

Por último se realizó un estudio de ingesta crónica (**Capítulo III: 9.3**). El objetivo inicial de este estudio era comprobar si existían o no marcadores del consumo habitual de aceite de oliva. Los estudios de intervención en humanos habían demostrado que el hidroxitirosol y el tirosol son biodisponibles tras una ingesta de aceite de oliva en su forma natural [18,43] y pueden emplearse como marcadores de consumo de este aceite. Sin embargo, los estudios llevados a cabo hasta el momento solo habían estado orientados a la detección de estos marcadores en el periodo postprandial tras la ingesta aguda de una dosis de aceite. Por ello se planteó buscar un marcador o marcadores de consumo habitual de aceite de

oliva, que justificase los beneficios detectados en los estudios epidemiológicos donde la ingesta de aceite de oliva virgen forma parte de la dieta diaria y por lo tanto más próxima a la realidad.

Para ello se trabajó con dos grupos de voluntarios, en uno se encontraban los consumidores habituales del aceite de oliva, entendiendo como habitual personas que habían consumido más de 23 g/día de aceite durante más de 10 años. En el grupo de no consumidores, los participantes se caracterizaban por no incluir aceite de oliva en su dieta habitual. En este caso se seleccionaron personas de origen rumano que en su vida habían consumido este tipo de grasa. En ambos casos, la extracción de sangre para obtener el plasma se realizó en condiciones de ayuno.

El análisis comparativo del perfil fenólico de ambos grupos, no permitió detectar alguna diferencia cualitativa. Concluyéndose que probablemente no existen marcadores de consumo prolongado de aceite de oliva y que los compuestos determinados podían corresponder a metabolitos endógenos. El estudio de identificación de los diferentes compuestos de naturaleza fenólica detectados en el plasma postprandial de los dos grupos de voluntarios, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, no permitió identificar las formas nativas, ni las principales formas conjugadas de los diferentes fenoles del aceite de oliva descritos como biomarcadores de consumo de aceite de oliva. Estos resultados permitirían establecer que los compuestos de naturaleza fenólica identificados en el plasma tras 12 horas de ayuno corresponden a metabolitos endógenos, probablemente compuestos derivados de la ruta de las catecolaminas. Ya se ha comentado anteriormente que estos compuestos se metabolizan de forma rápida (durante las 8 horas tras su ingesta). Se ha observado que, tras una ingesta de 50 mL de aceite de oliva, la vida media de eliminación del hidroxitirosol y el tirosol en orina son de 7,7 horas y 8,6 horas respectivamente, apareciendo los máximos de concentración en orina entre las 0 y las 4 horas después de la ingesta, y regresando a las condiciones basales a las 12 después de la ingesta [62,91]. Principalmente se excretan en forma glucuronido, detectándose tan solo entre un 6 y un 11% de las formas nativas del hidroxitirosol y del tirosol. Este rápido metabolismo y eliminación de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen podría explicar la no detección de estos compuestos en plasma basal en nuestro estudio. Con respecto al resto de fenoles aportados por el aceite de oliva virgen, como los flavonoides o los lignanos, prácticamente no hay datos al respecto.

Además de este rápido metabolismo y excreción por orina, se piensa que los compuestos fenólicos del aceite de oliva o sus metabolitos quedan asociados, durante el transporte, a las lipoproteínas mediante interacciones iónicas con las cargas residuales de la superficie de las partículas. Se ha demostrado también, que los derivados más lipofílicos pueden ser capaces de esterificarse con ácidos grasos en el plasma, aunque esta afirmación debería reforzarse con más estudios [69]. Este hecho podría haber dificultado la detección de estos compuestos en el plasma. También, estudios realizados por [90] D'Angelo (2001), indican la presencia de ciertos metabolitos en tejidos animales tales como, hígado, pulmón, corazón, riñón, cerebro y músculo esquelético, tras el suministro de hidroxitirosol vía oral o intravenoso. Los metabolitos detectados fueron: derivados sulfatados del hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilacetaldehído, ácido 3,4-dihidroxifenil acético, alcohol homovainílico y ácido homovainílico. Su teoría es que los fenoles del aceite se acumulan de forma rápida

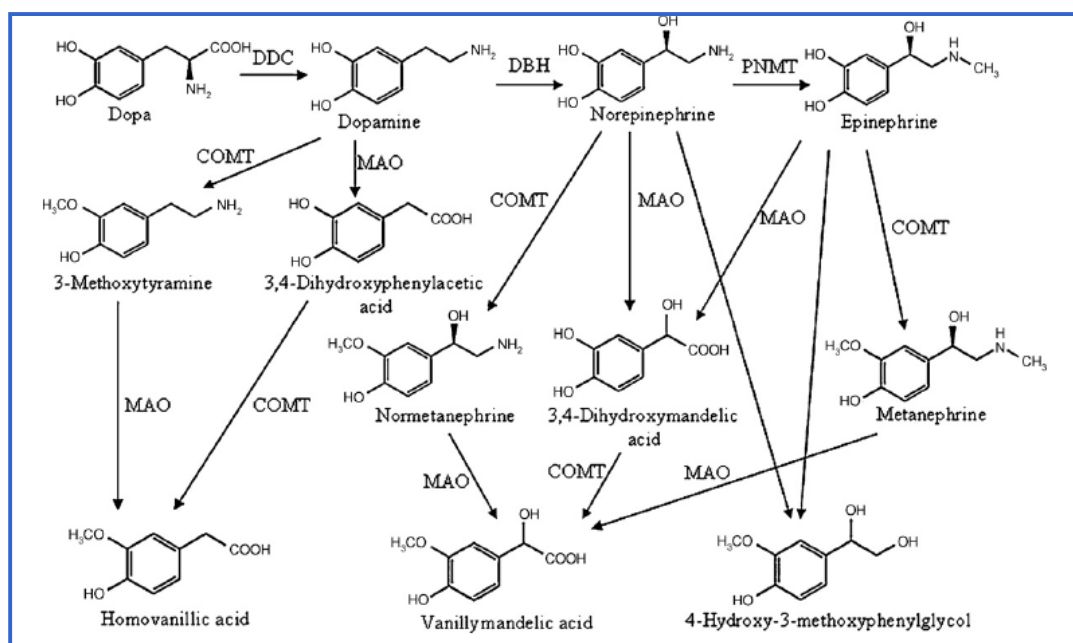
en los tejidos, con lo que no podrían detectarse en plasma, y dentro de las células se metabolizarían de nuevo. Pero todavía se conoce muy poco sobre la captación celular de los metabolitos en las distintas células. Si se ha visto que a pH fisiológico la mayoría de estos compuestos interactúan con la cabeza polar del grupo de fosfolípidos. Esto podría limitar el acceso de los agentes oxidantes a las células, y por tanto sería otro mecanismo de protección antioxidante de estos polifenoles, que podría corresponder al detectado en los test de capacidad antioxidante sobre células recogidos en el apartado 8.2 (**Capítulo II**).

Sin embargo, el análisis del plasma basal de nuestro estudio permitió la identificación de una serie de ácidos carboxílicos: ácido homovanílico, ácido ascórbico y una forma muy similar al ácido 3,4-dihidroxifenilacético. Por otro lado, en modo de ionización positiva se detectaron una serie de estructuras que se identificaron como derivados de la catecolamina, entre las que si se distinguieron: dopamina y tirosina, además se detectó triptófano, así como un posible flavonoide. Concluyéndose por tanto que los compuestos que se estaban determinando eran metabolitos endógenos de estructura fenólica.

Los rangos de concentración de los derivados de la catecolamina cuantificados en los plasmas de los dos grupos de voluntarios de nuestro estudio, están dentro de los niveles descritos en la bibliografía. Aura y col en el 2008 [92] indicaban que estos compuestos de estructura muy similar a los fenoles (con un grupo catecol en su molécula) podrían tener un origen exógeno por actuación de la microflora intestinal sobre los fenoles del aceite de oliva. Además, existen trabajos donde se ha detectado ácido homovanílico y 3,4-dihidroxifenilacético como metabolitos tras el consumo de aceite de oliva en ratas [90].

Al mismo tiempo estos metabolitos pueden ser productos del metabolismo endógeno de la dopamina, donde los aminoácidos tirosina y triptófano, también detectados en el plasma de los voluntarios, podrían ser los precursores de estos compuestos con actividad neurotransmisora en el sistema nervioso central y periférico. A partir de la tirosina se obtiene la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. La dopamina se metaboliza hasta ácido homovanílico y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), mientras que la noradrenalina y la adrenalina lo hace hasta 3,metoxi-4, hidroximandelico. En estas rutas metabólicas participa de una forma destacada la enzima COMT (catecol orto-metil transferasa) (Figura D 13). El triptófano es el precursor de la serotonina, N-acetilserotonina, ácido hidroxindolacético (5-HIAA) y la melatonina.





**Figura D 13** Rutas de la biosíntesis y metabolismo de la catecolamina. DDC, dihydroxyphenylalanine decarboxylase; DBH, dopamine  $\beta$ -hydroxylase; PNMT, phenylethanolamine *N*-methyltransferase; COMT, catechol-*O*-methyltransferase; MAO, monoamine oxidase [93].

Finalmente, el análisis comparativo de la concentración de los compuestos cuantificados en los plasmas de los dos grupos de voluntarios, consumidores habituales y no consumidores de aceite de oliva virgen, permitió detectar diferencias cuantitativas, a pesar de la gran variabilidad inter-individuo dentro de cada grupo. Se observó una mayor concentración media en el plasma del grupo de consumidores habituales de aceite de oliva virgen, frente a las concentraciones medias en el plasma del grupo de no consumidores. Incluso 2 de los 17 compuestos estudiados mostraban diferencias estadísticamente significativas en su concentración, independientemente de los factores sexo y edad. Estos datos permiten establecer que posiblemente el consumo habitual de aceite de oliva, gracias a su fracción fenólica, puede proteger a los metabolitos endógenos de naturaleza fenólica, lo que indicaría un efecto protector indirecto en consumidores habituales de aceite de oliva virgen. Además, existen diferentes estudios que han demostrado que los neurotransmisores tipo catecolamina y los derivados del triptófano, metabolitos endógenos cuantificados en nuestro estudio, poseen capacidad secuestrante de los radicales libres y poder neuroprotector [94-96]. Forman parte por tanto del sistema antioxidante endógeno.

Otros autores como [43] Marrugat y col. en el 2004, apuntaban esta hipótesis y concluían que los fenoles del aceite de oliva podían modular el equilibrio oxidante/antioxidante en el plasma en situaciones de estrés oxidativo, potenciando así su rol protector antioxidante. [61] Miro-Casas y col (2003) se plantearon la posibilidad de que el hidroxitirosol de la dieta y el hidroxitirosol como producto del metabolismo de la dopamina podían participar conjuntamente como un sistema antioxidante en el organismo. Sin embargo, demostrar el

efecto de los fenoles dietéticos sobre los fenoles endógenos es complejo, ya que estos últimos se encuentran en muy baja concentración y existe un gran número de compuestos muy similares que dificulta su completa identificación [93].

Se plantean dos posibles causas por las cuales el consumo de aceite de oliva de forma habitual mantiene más elevadas las cantidades de metabolitos endógenos con poder antioxidante en el organismo. Por un lado, se ha visto que los compuestos fenólicos aportados por la dieta, actúan como sustrato competidores de los sustratos endógenos propios de la enzima COMT. Esta enzima introduce grupos metilo en las posiciones -OH, lo que explicaría las concentraciones más altas de metabolitos cuantificadas en los plasmas del grupo de consumidores habituales de aceite de oliva. Por otro lado, [97] Oi-Karo y col. (2007) observaron como la fracción fenólica de aceite de oliva, tanto en ratas como en humanos, aumentaba la secreción de adrenalina y noradrenalina en el plasma, y a su vez el catabolismo de triglicéridos y la activación de la termogénesis.

Por tanto, los resultados de nuestro estudio junto con las hipótesis adelantadas por estudios previos llevados a cabo por otros autores refuerzan nuestra hipótesis de que los fenoles del aceite de oliva, además de un efecto antioxidante directo, podrían ejercer un efecto protector indirecto mediante la protección de la defensa antioxidante propia del organismo.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, et al.: *Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics*. Mass Spectrometry Reviews. **2005**, 24(1): 55-99.
2. Halliwell B and Whiteman M: *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?* British Journal of Pharmacology. **2004**, 142(2): 231-255.
3. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, et al.: *Determination of carbonyl groups in oxidized proteins*. Methods in Molecular Biology (Totowa, New Jersey). **2000**, 99(Stress Response): 15-24.
4. Pryor WA: *Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials*. Free radical biology & medicine. **2000**, 28(1): 141-64.
5. Salami M, Galli C, De Angelis L, and Visioli F: *Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol*. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society. **1995**, 31(5): 275-9.
6. Visioli F and Galli C: *Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1998**, 46(10): 4292-4296.
7. Galli C and Visioli F: *Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet*. Lipids. **1999**, 34(Suppl., Fatty Acids and Lipids from Cell Biology to Human Diseases): S23-S26.
8. Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JLFC, Reis S, et al.: *Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-A structure-activity relationship study*. Free Radical Research. **2006**, 40(4): 433-442.
9. Kaur C and Kapoor HC: *Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health*. International Journal of Food Science and Technology. **2001**, 36(7): 703-725.
10. Huang D, Ou B, and Prior RL: *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(6): 1841-1856.
11. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, et al.: *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions*. Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. **2005**, 579(1-2): 200-213.
12. Visioli F, Bellomo G, and Galli C: *Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **1998**, 247(1): 60-64.
13. Galli C, Petroni A, and Visioli F: *Natural antioxidants, with special reference to those in olive oil, and cell protection*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. **1994**, 2(1-2): 67-8.
14. Carr AC, Decker EA, Park Y, and Frei B: *Comparison of low-density lipoprotein modification by myeloperoxidase-derived hypochlorous and hypobromous acids*. Free Radical Biology & Medicine. **2001**, 31(1): 62-72.
15. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, et al.: *The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen*

- metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells*. Journal of Nutrition. **1997**, 127(2): 286-292.
16. Manna C, Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, et al.: *Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity*. Advances in Experimental Medicine and Biology. **1999**, 472(Advances in Nutrition and Cancer 2): 115-130.
  17. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro G, et al.: *Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages*. Journal of Nutritional Biochemistry. **1999**, 10(3): 159-165.
  18. Miro-Casas E, Farre Albaladejo M, Covas M-I, Rodriguez JO, et al.: *Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry Quantitative Determination of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Human Urine after Olive Oil Intake*. Analytical Biochemistry. **2001**, 294(1): 63-72.
  19. Hollman PCH and Katan MB: *Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man*. Archives of Toxicology, Supplement. **1998**, 20(Diversification in Toxicology: Man and Environment): 237-248.
  20. Hollman PCH and Katan MB: *Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man*. Biomedicine & Pharmacotherapy. **1997**, 51(8): 305-310.
  21. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, et al.: *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. Lancet. **1993**, 342(8878): 1007-11.
  22. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, et al.: *Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers*. Journal of Natural Products. **1998**, 61(1): 71-76.
  23. Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, et al.: *Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. **2007**, 15(4): 1749-1770.
  24. Shahidi F : *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. AOCS press. **1997**. 414 pp.
  25. Das NP and Pereira TA: *Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **1990**, 67(4): 255-8.
  26. Hayes RE, Bookwalter GN, and Bagley EB: *Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - a review*. Journal of Food Science. **1977**, 42(6): 1527-32.
  27. Hudson BJB and Lewis JI: *Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity*. Food Chemistry. **1983**, 10(1): 47-55.
  28. Morello J-R, Vuorela S, Romero M-P, Motilva M-J, et al.: *Antioxidant Activity of Olive Pulp and Olive Oil Phenolic Compounds of the Arbequina Cultivar*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(6): 2002-2008.
  29. Artajo LS, Romero MP, Morello JR, and Motilva MJ: *Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds: Evaluation of Their Antioxidant Activity and Their Effect on the Bitter Index*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54(16): 6079-6088.
  30. Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, et al.: *Antioxidant and Other Biological Activities of Olive Mill Wastewaters*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1999**, 47(8): 3397-3401.

31. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, and Galli C: *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents*. *Atherosclerosis* (Shannon, Ireland). **1995**, 117(1): 25-32.
32. Visioli F, Bellosta S, and Galli C: *Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages*. *Life Sciences*. **1998**, 62(6): 541-546.
33. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, et al.: *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil*. *Clinical Chemistry* (Washington, D. C.). **2000**, 46(7): 976-988.
34. Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, et al.: *Proanthocyanidins in health care: Current and new trends*. *Current Medicinal Chemistry*. **2004**, 11(10): 1345-1359.
35. Williams RJ, Spencer JPE, and Rice-Evans C: *Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?* *Free Radical Biology & Medicine*. **2004**, 36(7): 838-849.
36. Rice-Evans C, Miller NJ, and Paganga G: *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. *Free Radical Biology & Medicine*. **1996**, 20(7): 933-956.
37. Lamuela-Raventos RM, Covas M-I, Fito M, Marrugat J, et al.: *Detection of dietary antioxidant phenolic compounds in human LDL*. *Clinical Chemistry* (Washington, D. C.). **1999**, 45(10): 1870-1872.
38. Palozza P, Serini S, Di Nicuolo F, Piccioni E, et al.: *Prooxidant effects of beta - carotene in cultured cells*. *Molecular Aspects of Medicine*. **2003**, 24(6): 353-362.
39. Filipe P, Morliere P, Patterson LK, Hug GL, et al.: *Repair of Amino Acid Radicals of Apolipoprotein B100 of Low-Density Lipoproteins by Flavonoids. A Pulse Radiolysis Study with Quercetin and Rutin*. *Biochemistry*. **2002**, 41(36): 11057-11064.
40. Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, de la Torre-Boronat MC, et al.: *Rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of retinol, alpha -tocopherol and beta -carotene in human plasma and low-density lipoproteins*. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*. **2001**, 758(2): 315-322.
41. Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, De la Torre MC, et al.: *The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, alpha - tocopherol, and beta -carotene) in virgin olive oil*. *Food Chemistry*. **2002**, 78(2): 207-211.
42. Moreno JJ: *Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7*. *Free Radical Biology & Medicine*. **2003**, 35(9): 1073-1081.
43. Marrugat J, Covas M-I, Fito M, Schroeder H, et al.: *Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation: A randomized controlled trial*. *European Journal of Nutrition*. **2004**, 43(3): 140-147.
44. Covas MI, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Sebastia N, et al.: *Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation*. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*. **2000**, 20(3/4): 49-54.
45. Covas M-I: *Olive oil and the cardiovascular system*. *Pharmacological Research*. **2007**, 55(3): 175-186.

46. Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, et al.: *Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation*. *Lipids*. **2000**, 35(6): 633-638.
47. Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, et al.: *Olive oil and inhibition of low density lipoprotein oxidation. Role of phenolic compounds*. *Medicina clinica*. **2000**, 115(5): 166-9.
48. Rimm EB and Stampfer MJ: *Antioxidants for vascular disease*. *Medical Clinics of North America*. **2000**, 84(1): 239-249.
49. Price JF: *Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease. The epidemiological evidence*. *European Heart Journal*. **1997**, 18(5): 719-727.
50. Violi F, Micheletta F, and Iuliano L: *Antioxidants and atherosclerosis*. *European Heart Journal Supplements*. **2002**, 4(Suppl. B): B17-B21.
51. Tavani A and La Vecchia C: *beta -carotene and risk of coronary heart disease. A review of observational and intervention studies*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **1999**, 53(9): 409-416.
52. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, et al.: *Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial*. *Journal of the National Cancer Institute*. **1996**, 88(21): 1550-9.
53. Carroll YL, Corridan BM, and Morrissey PA: *Lipoprotein carotenoid profiles and the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in healthy elderly volunteers*. *European Journal of Clinical Nutrition*. **2000**, 54(6): 500-507.
54. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, et al.: *Olive oil phenols are absorbed in humans*. *Journal of Nutrition*. **2002**, 132(3): 409-417.
55. Visioli F: *Antioxidants in Mediterranean diets*. *World Review of Nutrition and Dietetics*. **2000**, 87(Mediterranean Diets): 43-55.
56. Weinbrenner T, Fito M, Farre Albaladejo M, Saez GT, et al.: *Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans*. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. **2004**, 30(5/6): 207-212.
57. Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, et al.: *Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells*. *FEBS Letters*. **2000**, 470(3): 341-344.
58. Vissers MN, Zock PL, and Katan MB: *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review*. *European Journal of Clinical Nutrition*. **2004**, 58(6): 955-965.
59. Corona G, Tzounis X, Dessi MA, Deiana M, et al.: *The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation*. *Free Radical Research*. **2006**, 40(6): 647-658.
60. Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, et al.: *Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration*. *Journal of Nutrition*. **2003**, 133(8): 2612-2615.
61. Miro-Casas E, Covas M-I, Farre M, Fito M, et al.: *Hydroxytyrosol disposition in humans*. *Clinical Chemistry (Washington, DC, United States)*. **2003**, 49(6, Pt. 1): 945-952.
62. Miro-Casas E, Covas MI, Fito M, Farre-Albadalejo M, et al.: *Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans*. *European Journal of Clinical Nutrition*. **2003**, 57(1): 186-190.

63. Edgecombe SC, Stretch GL, and Hayball PJ: *Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine*. Journal of Nutrition. **2000**, 130(12): 2996-3002.
64. Bazoti FN, Gikas E, Puel C, Coxam V, et al.: *Development of a Sensitive and Specific Solid Phase Extraction-Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Elenolic Acid, Hydroxytyrosol, and Tyrosol in Rat Urine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(16): 6213-6221.
65. Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, et al.: *The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats*. Journal of Nutrition. **2001**, 131(7): 1993-1996.
66. Del Boccio P, Di Deo A, De Curtis A, Celli N, et al.: *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration*. Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. **2003**, 785(1): 47-56.
67. Parada J and Aguilera JM: *Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients*. Journal of Food Science. **2007**, 72(2): R21-R32.
68. Bravo L and Saura-Calixto F: *Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace*. American Journal of Enology and Viticulture. **1998**, 49(2): 135-141.
69. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, et al.: *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. American Journal of Clinical Nutrition. **2004**, 79(5): 727-747.
70. Bourne LC and Rice-Evans C: *Bioavailability of ferulic acid*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **1998**, 253(2): 222-227.
71. Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, et al.: *Regioselectivity of Phase II Metabolism of Luteolin and Quercetin by UDP-Glucuronosyl Transferases*. Chemical Research in Toxicology. **2002**, 15(5): 662-670.
72. Dinnella C, Minichino P, D'Andrea AM, and Monteleone E: *Bioaccessibility and Antioxidant Activity Stability of Phenolic Compounds from Extra-Virgin Olive Oils during in Vitro Digestion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2007**, 55(21): 8423-8429.
73. Shishikura Y, Khokhar S, and Murray BS: *Effects of Tea Polyphenols on Emulsification of Olive Oil in a Small Intestine Model System*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54(5): 1906-1913.
74. Ruano J, Lopez-Miranda J, de la Torre R, Delgado-Lista J, et al.: *Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients*. American Journal of Clinical Nutrition. **2007**, 86(2): 341-346.
75. Visioli F, Bogani P, Grande S, and Galli C: *Olive oil and oxidative stress*. Grasas y Aceites (Sevilla, Spain). **2004**, 55(1): 66-75.
76. Vanharanta M, Voutilainen S, Lakka TA, van der Lee M, et al.: *Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study*. Lancet. **1999**, 354(9196): 2112-5.
77. Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, et al.: *Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids*. Journal of Nutrition. **2002**, 132(7): 1956-1961.

78. Mateos R, Goya L, and Bravo L: *Metabolism of the olive oil phenols hydroxytyrosol, tyrosol, and hydroxytyrosyl acetate by human hepatoma HepG2 cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53(26): 9897-9905.
79. Caruso D, Visioli F, Patelli R, Galli C, et al.: *Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans*. Metabolism, Clinical and Experimental. **2001**, 50(12): 1426-1428.
80. Tuck KL and Hayball PJ: *Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects*. Journal of Nutritional Biochemistry. **2002**, 13(11): 636-644.
81. Tuck KL, Hayball PJ, and Stupans I: *Structural Characterization of the Metabolites of Hydroxytyrosol, the Principal Phenolic Component in Olive Oil, in Rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2002**, 50(8): 2404-2409.
82. de la Torre-Carbot K, Jauregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, et al.: *Rapid high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil phenolic metabolites in human low-density lipoproteins*. Journal of Chromatography, A. **2006**, 1116(1-2): 69-75.
83. Kountouri AM, Mylona A, Kaliora AC, and Andrikopoulos NK: *Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of Olea europaea (olives): impact on plasma antioxidant status in humans*. Phytomedicine. **2007**, 14(10): 659-667.
84. Kern SM, Bennett RN, Needs PW, Mellon FA, et al.: *Characterization of Metabolites of Hydroxycinnamates in the in Vitro Model of Human Small Intestinal Epithelium Caco-2 Cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2003**, 51(27): 7884-7891.
85. R. Barrington GW, R.N. Bennett, B.D. Davis, J.S. Brodbelt and P.A. Kroon *Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/TC7 cell model*. Journal of Functional Foods. **2009**, 1: 74-97.
86. Siu pong Ng W, Ka Yin ; Zhang, Li ; Zuo, Zhong ; Lin, Ge ; : *Evaluation of the first-pass glucuronidation of selected flavones in gut by Caco-2 monolayer model*. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences. **2005**, 8(1): 1-9.
87. Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, et al.: *Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen*. American Journal of Physiology. **1999**, 277(1, Pt. 1): G120-G126.
88. Andlauer W, Stumpf C, and Fuerst P: *Influence of the Acetification Process on Phenolic Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2000**, 48(8): 3533-3536.
89. Lamensdorf I, Hrycyna C, He LP, Nechushtan A, et al.: *Acidic dopamine metabolites are actively extruded from PC12 cells by a novel sulfonylurea-sensitive transporter*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. **2000**, 361(6): 654-64.
90. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, et al.: *Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil*. Drug Metabolism and Disposition. **2001**, 29(11): 1492-1498.
91. Covas M-I, de la Torre K, Farre-Albaladejo M, Kaikkonen J, et al.: *Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans*. Free Radical Biology & Medicine. **2006**, 40(4): 608-616.



92. Aura A-M: *Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon*. Phytochemistry Reviews. **2008**, 7(3): 407-429.
93. Gu Q, Shi X, Yin P, Gao P, et al.: *Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta. **2008**, 609(2): 192-200.
94. Siraki AG and O'Brien PJ: *Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters*. Toxicology. **2002**, 177(1): 81-90.
95. Troadec J-D, Marien M, Darios F, Hartmann A, et al.: *Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress*. Journal of Neurochemistry. **2001**, 79(1): 200-210.
96. Oxenkrug G, Requintina P, and Bachurin S: *Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin and melatonin in the in vivo models*. Annals of the New York Academy of Sciences. **2001**, 939(Neuroprotective Agents): 190-199.
97. Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, et al.: *Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats*. Journal of Nutritional Biochemistry. **2007**, 18(10): 685-692.





## **11. CAPÍTULO V: CONCLUSIONES**



### **Determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva**

1. Los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante de los componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva sobre la fracción lipídica de la LDL, en el modelo de dienos conjugados, han mostrado que la luteolina, la rutina, el 3,4-DHPEA-EDA, el hidroxitirosol y la oleuropeína muestran una actividad antioxidante significativamente superior a la del alfa-tocoferol.
2. Adicionalmente, estos fenoles más activos han mostrado un efecto sinérgico en este mismo modelo, incrementando la resistencia a la oxidación de la LDL.
3. En relación con la modificación oxidativa de las fracciones proteica y lipídica de la LDL, evaluada mediante la cuantificación de marcadores de peroxidación de proteínas (carbonilos, GSA, AASA y MDAL) y de lípidos (POVPC y PGPC) en LDL oxidada, los fenoles más activos han sido: luteolina, hidroxitirosol, 3,4-DHPEA-EDA, p-HPEA-EDA, ácido cafeico, acetoxipinoresinol, pinoresinol y ácido gálico. En todos los modelos el hidroxitirosol ha mostrado la máxima eficacia, mientras que la efectividad del resto de los fenoles varía en función del modelo de oxidación.
4. En el modelo de evaluación del daño celular (células endoteliales) por efecto de la LDL-oxidada, el hidroxitirosol y la luteolina han mostrado el máximo efecto protector.
5. Las diferencias observadas en cuanto a la eficacia de los fenoles estudiados en los diferentes modelos son atribuibles a diferencias en su estructura molecular. Atribuyéndose la máxima eficacia a la presencia de una estructura 3,4-dihidroxi en el anillo aromático de la molécula.
6. La detección en plasma humano de algunas de los compuestos fenólicos que han mostrado un buen efecto protector de la oxidación de la LDL en los modelos *in vitro*, refuerza la hipótesis del potencial antioxidante *in vivo* de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen en las primeras etapas del desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

### **Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva.**

1. La mayor parte de los fenoles del aceite de oliva virgen han mostrado una buena estabilidad bajo las condiciones de digestión gástrica. Por el contrario, la estabilidad de algunos de estos compuestos, cuando están expuestos a las condiciones de digestión del intestino delgado, es muy baja, especialmente los derivados secoiridoides. La hidrólisis de estos compuestos da lugar a un incremento del contenido de hidroxitirosol, tirosol y ácido elenólico en la mezcla de digestión. Esto indicaría una mayor bioaccesibilidad de estas formas fenólicas simples, en relación con las formas más complejas presentes en el aceite, que podría explicar su eficacia como marcadores de consumo de aceite de oliva virgen.

2. El metabolismo en el modelo celular Caco2/TC7 ha mostrado la formación de todas las formas conjugadas esperables a partir del metabolismo de Fase II: formas glucuronidadas, sulfatadas y metiladas, siendo las formas metiladas las más abundantes. Se han observado diferencias cualitativas y cuantitativas en función del compuesto fenólico.
3. El transporte a través de la monocapa celular ha mostrado un flujo desde la zona apical a la zona basolateral de los diferentes metabolitos y sus formas nativas, dependiente del tiempo de incubación.
4. El análisis del perfil fenólico de plasma basal recogido en situación de ayuno, no ha mostrado diferencias cualitativas entre consumidores habituales de aceite de oliva y no consumidores. Sin embargo, el análisis cuantitativo ha mostrado una mayor concentración de los compuestos analizados en el plasma de individuos consumidores de aceite de oliva, con diferencias estadísticamente significativas para dos compuestos
5. Estos resultados podrían indicar que los compuestos cuantificados en el plasma basal corresponden a metabolitos endógenos derivados de los fenoles de la dieta y/o del metabolismo de las catecolaminas. Por tanto, no se ha podido establecer un marcador de consumo de aceite de oliva en las dosis diarias habituales para una Dieta Mediterránea.

Como conclusión final, los resultados de este estudio junto con las hipótesis adelantadas por estudios previos llevados a cabo por otros autores refuerzan nuestra hipótesis de que los fenoles del aceite de oliva, además de un efecto antioxidante directo, podrían ejercer un efecto saludable sobre la salud de sus consumidores.