



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Triterpenos pentacíclicos y compuestos fenólicos
en aceitunas arbequinas y su determinación por
cromatografía líquida acoplada a espectrometría de
masas. Efecto de su ingesta sobre la farmacocinética
de los compuestos triterpénicos y la presión arterial
en ratas y voluntarios sanos.**

Talía Franco Ávila

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**TRITERPENOS PENTACÍCLICOS Y COMPUESTOS
FENÓLICOS EN ACEITUNAS ARBEQUINAS Y SU
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS. EFECTO DE
SU INGESTA SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE LOS
COMPUESTOS TRITERPÉNICOS Y LA PRESIÓN ARTERIAL
EN RATAS Y VOLUNTARIOS SANOS.**

Talia Franco Avila
Barcelona, 2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
Departament de Bioquímica i Fisiologia, Secció de Fisiologia

Programa de doctorado:
BIOTECNOLOGIA

**TRITERPENOS PENTACÍCLICOS Y COMPUESTOS
FENÓLICOS EN ACEITUNAS ARBEQUINAS Y SU
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS. EFECTO DE
SU INGESTA SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE LOS
COMPUESTOS TRITERPÉNICOS Y LA PRESIÓN ARTERIAL
EN RATAS Y VOLUNTARIOS SANOS.**

Memoria presentada por **Talia Franco Avila** para optar al Título de Doctor por la Universitat de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada en el grupo de *Fisiologia i Nutrició Experimental* bajo la supervisión de la **Dra. Joana Maria Planas Rosselló** y la **Dra. Maria Emília Juan Olivé**.

Dra. Joana Maria Planas Rosselló
(Directora de la tesis)

Dra. Maria Emília Juan Olivé
(Directora de la tesis)

Dra. Joana Maria Planas Rosselló
(Tutora de la tesis)

Talia Franco Avila
(Doctoranda)

Talia Franco Avila
Barcelona, 2021

Esta tesis ha sido subvencionada por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013- 41188) y la Generalitat de Catalunya (2014SGR1221 y 2017SGR945). Durante su realización, la doctoranda ha disfrutado de una "Beca para Programas en el Extranjero" del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT 694584, desde enero de 2017 a 2021). La asistencia a congresos ha sido subvencionada por la Comissió de Recerca de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació mediante bolsas de viaje. La tesis se ha llevado a cabo en el grupo de investigación consolidado *Fisiologia i Nutrició Experimental* de la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona y en Tècniques Separatives dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT-UB).

A mis padres Enrique y Rosario,
y a mis hermanos Enrique y Karina

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a las directoras de mi Tesis, las Dras. Joana M. Planas y M. Emília Juan. Sabía que esta etapa sería todo un desafío, pero gracias a su tiempo, paciencia y esfuerzo he cumplido uno de los sueños más grandes de mi vida. En todo momento, ellas, mis dos mentoras, resolvieron mis inquietudes y preguntas. Me orientaron en la planeación de los experimentos, me supervisaron en el análisis de las muestras, me enseñaron como utilizar los equipos, me instruyeron en el análisis de los resultados, me alentaron en la preparación de resúmenes y carteles para los congresos, pusieron toda su positividad y experiencia en la redacción de los artículos y finalmente, me acompañaron de forma muy cercana en la redacción de mi tesis de doctorado. Ahora mismo, no encuentro las palabras para agradecer todo el apoyo, aliento, motivación y conocimiento que ambas me han ofrecido. Nunca olvidaré todos sus consejos, comentarios, correcciones y lecciones, y sé que, en el futuro, cada vez que me tropiece con un desafío, recordaré la rigurosidad, versatilidad y pasión de la Dra. Joana Planas; y la inteligencia, perspicacia y calidez de la Dra. Emília Juan. Doctoras, gracias por ser mi familia en Barcelona.

Agradezco también a la Universitat de Barcelona por haberme aceptado dentro de uno de sus programas de doctorado y al Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació por haberme acogido tan bien durante todos estos años. Doy gracias a la Universidad de Guadalajara, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Fondo para el Desarrollo de Recursos Humanos, instituciones asentadas en México, por proporcionarme las bases profesionales y proveerme de los recursos económicos para realizar mis estudios de doctorado en España.

Hacer el doctorado es toda una aventura que viene condimentada con compañeros, compañeros que se convierten en colegas y colegas que se convierten en amigos. Por ello, quiero agradecer a la ahora Dra. Rocío Moreno por ser como una hermana mayor que siempre me aconsejó y asistió cuando lo necesitaba. Rocío, ensalzo tu resiliencia y dedicación. Agradezco a la ahora también Dra. Ivana Kundisová por su paciencia y disposición, ella ha sido como una hermana menor que me hizo los experimentos maratónicos aún más divertidos y pasaderos. Ivana, admiro tu dinamismo y positivismo. Y agradezco al miembro más nuevo del equipo, a Aldo, él aportó sazón al grupo y sé que algún día estarás sentado escribiendo lo mismo que yo. Aldo, elogio tu ser inquisitivo e imaginativo. Gracias también a mis compañeras estudiantes de Erasmus, Grado o Máster, es decir a Aminah, Lucía, Celi y Karolina por aportarme esa fugaz frescura en su paso por nuestros despachos y laboratorios.

Por otra parte, me gustaría dedicar un agradecimiento muy especial al Dr. Miquel Moretó, la Dra. Conxita Amat y la Dra. Anna Pérez por empaparame de su amabilidad y conocimientos, y por regalarme

una sonrisa cada día, e incluso varias veces al día cuando nos veíamos por los pasillos. A la energética Dra. Lluïsa Miró, gracias por dedicarme tu tiempo, tu espacio, tus mensajes y tu apoyo en todo momento. Lluïsa, admiro tu vitalidad y consagración a cada tarea que realizas. A Cristina y Núria gracias por contagiarme de su simpatía, espero tener el placer de algún día trabajar con ustedes. A las Dras. Pilar Vinardell, Montse Mitjans y Carmen Morán, las recordaré principalmente por su tenacidad, admiraba el verlas trabajando de lleno en los laboratorios. Mi profundo afecto a las Dras. Ruth Ferrer y Raquel Martín por su eficiencia y cariño, ellas siempre me contagiaban de buen humor y sosiego. A las Dras. Margarida Castell, Àngels Franch, M^a José Rodríguez y los Dres. Francisco J. Pérez y Manel Rabanal, por sus constructivos comentarios que me compartieron en el Posgrado en Ciencias Farmacéuticas, fueron de utilidad para mejorar el enfoque de mis resultados. A la Dra. Carme Pelegrí y al Dr. Jordi Vilaplana por su gentileza y cordialidad. A la Dra. Trinitat Cambras y al Dr. Antoni Diez por otorgarme la confianza de trabajar en el espacio del estabulario dedicado a sus cuidadosos experimentos. A mis compañeros que están en el inicio de su doctorado, que ya han terminado, que están en su formación postdoctoral o que ya son profesores o investigadores, Marta Riba, Patricia Ruiz, Karla Rio, Marta Pérez, Carla Morales, Joan Campo, Adrià Farràs, Adriana Maddaleno, Blanca Grases, Malén Massot, Ignasi Azagra, Mar Abril, Mariona Camps, Elisabet Augé, Paulina Torres y Sheila Estruel gracias por su espontaneidad, simpatía y por hacer especiales las efemérides del Departamento. Por último, en este apartado me gustaría mencionar al personal de administración de la Sección de Fisiología, Vanessa y David, gracias por ser los primeros en brindarme unos buenos días y por su loable trabajo en auxiliarnos con las tareas administrativas y de gestión.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Juan Carlos Laguna por aconsejarme y facilitarme el equipo de medición de la presión arterial en ratas. También estoy muy agradecida con la Dra. Helena Colom, quien me introdujo con amabilidad y paciencia en el mundo de la farmacocinética, al igual que siempre se mostró asequible en el uso de sus ordenadores. Dra. Helena, gracias por siempre esquematizarme los complicados conceptos de la farmacocinética y hacerlos más comprensibles. Mi sincero reconocimiento al personal de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiT-UB), en especial al Dr. Isidre Casals, Dra. Olga Jáuregui, Dr. Alberto Adeva y David Bellido por ofrecerme sus consejos, apoyo técnico y paciencia en mi estancia en el Parc Científic. Los admiro por su nivel de conocimiento y profesionalidad. Además, estoy muy agradecida con el personal del estabulario de la facultad, especialmente con la Dra. Teresa Rodrigo, David Pérez, Marta Medel y Paula Queralt por su apoyo en el manejo y gestión de los animales de laboratorio. Expreso también mi gratitud a la Cooperativa Maials que nos distribuyó las aceitunas, alimento indispensable en todos mis experimentos.

En mi lista de agradecimientos me gustaría incluir a la Dra. Josefa Badia, Coordinadora del Programa de Doctorado en Biotecnología, su implicación en el seguimiento de mi doctorado ha sido pieza clave en la culminación de mi tesis. A la Comisión de Doctorado, por su versatilidad y excelente trabajo, adecuándose a cada circunstancia que se ha presentado. A la Secretaría de la Facultad, por su amabilidad y gestión durante todos estos años, me tenían fichada por todas las copias del expediente académico que les he solicitado. Al personal responsable del servicio de bar y restauración por alegrarme el día cada vez que bajábamos por un poco de energía en forma de café y pan con tomate. Y también, quiero expresar mi más respetuoso agradecimiento a mi tribunal, los Dres. Josep Lluís Torres, Ana Calpena, Ana Isabel Álvarez de Felipe, Helena Colom y Gracia Merino, quienes han cedido su tiempo para dedicarlo a la evaluación de mi tesis.

Por último, quisiera agradecer a toda mi familia y amigos. Gracias por protegerme, por inspirarme, por enseñarme y por simplemente estar aquí, acompañándome. A mis abuelos, que sonreían porque decían que me veía demasiado joven o que creían que sería una doctora de esas que curan humanos. A mi tía Rafaela, por cuidarme y consentirme como si fuera su propia nieta. A mis padres, quienes me han manifestado su apoyo de manera incondicional y me alentaron a seguir mis sueños. A mis hermanos, que siempre han creído en mí y a sus parejas que se han convertido en mis amigos. A todos mis tíos, que festejaban mis logros como si fueran propios. A mis amigos, que siempre me han escuchado sin importar la hora y me han enviado por paquetería exprés los ánimos que en varias ocasiones necesitaba. A mi perrita Justina por enseñarme que la vida está cargada de pequeñas alegrías. A la ciudad y gente de Barcelona por ampliar mi horizonte. Y finalmente, a mi novio Rafael y a su familia. Gracias por ayudarme a encontrar mi fortaleza, por escucharme, por aceptarme y por cargarme de energía positiva.

Gracias a todos, no podría haberme rodeado de personas tan extraordinarias y sé que, sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible.

Índice	I
Índice de figuras	XIII
Índice de tablas	XIX
Abreviaturas	XXV
Resumen de la tesis	1
1. Introducción	5
1.1. El olivo.....	5
1.1.1. Evolución histórica del cultivo del olivo	5
1.1.2. Características del olivo	7
1.1.2.1. Taxonomía.....	7
1.1.2.2. Ecología y descripción botánica	7
1.1.2.3. Distribución del cultivo de oliva en la actualidad	8
1.1.2.4. Principales variedades de olivo	9
1.1.2.5. Consumo de la oliva	10
1.1.3. Las aceitunas.....	10
1.1.3.1. Proceso para la elaboración de aceitunas	10
1.1.3.2. Estilos comerciales de aceitunas.....	11
1.1.3.3. Aceitunas con Denominación de Origen Protegida.....	12
1.1.3.4. La aceituna de la variedad Arbequina	12
1.1.4. Composición nutricional de <i>Olea europaea</i> L.....	12
1.1.4.1. Las hojas del olivo	12
1.1.4.2. Las olivas	13
1.1.4.3. Las aceitunas	13
1.2. Compuestos bioactivos en las aceitunas: triterpenos pentacíclicos y polifenoles	15
1.2.1. Triterpenos pentacíclicos	15
1.2.1.1. Síntesis de triterpenos pentacíclicos	15

Índice

1.2.1.2. Triterpenos pentacíclicos en <i>Olea europaea</i> L.....	15
a) Ácido maslínico	16
b) Ácido oleanólico	16
c) Ácido ursólico	17
d) Eritrodiol.....	17
e) Uvaol.....	17
1.2.2. Polifenoles	17
1.2.2.1. Síntesis de polifenoles	17
1.2.2.2. Polifenoles en <i>Olea europaea</i> L.	18
a) Apigenina	19
b) Ácido cafeico	19
c) Ácido <i>p</i> -cumárico.....	19
d) Ácido vanílico.....	20
e) Catecol.....	20
f) Hidroxitirosol.....	20
g) Hidroxitirosol acetato.....	20
h) Luteolina	21
i) Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido	21
j) Oleuropeína.....	21
k) (+)-Pinoresinol	22
l) Quercetina	22
m) Rutina.....	22
n) Salidroside.....	22
ñ) Tirosol	23
o) Verbascósido.....	23
2. Objetivos.....	25

3. Materiales y métodos	29
3.1. Analitos, disolventes y soluciones stock.....	29
3.2. Equipos cromatográficos	29
3.3. Animales de experimentación.....	30
3.4. Sujetos de investigación	31
3.4.1. Tamaño de muestra.....	31
3.4.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	31
3.5. Aceitunas de la variedad Arbequina	33
3.5.1. Composición nutricional.....	33
3.5.2. Selección de las dosis para los estudios en ratas	33
3.5.3. Preparación de la suspensión de aceitunas administrada a ratas.....	34
3.5.4. Selección de las dosis para las intervenciones nutricionales	35
3.6. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina.....	35
3.6.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina	35
3.6.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 por LC-MS.....	36
3.6.2.1. Análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016	36
a) Condiciones cromatográficas	36
b) Condiciones de espectrometría de masas	37
3.6.2.2. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016	38
3.6.2.3. Validación del método utilizado para el análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016	38
a) Precisión y exactitud	39
b) Linealidad	39
c) Sensibilidad	39

d) Carry-over	39
3.6.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-MS.....	40
3.6.3.1 Análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017	40
a) Condiciones cromatográficas	40
b) Condiciones de espectrometría de masas	40
3.6.3.2. Análisis de polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017	41
a) Condiciones cromatográficas	41
b) Condiciones de espectrometría de masas	42
3.6.3.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017	43
3.6.3.4. Validación del método utilizado para el análisis triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-MS	44
3.7. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata.....	44
3.7.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial.....	44
3.7.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial	45
3.8. Concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Arbequina.....	45
3.8.1. Diseño experimental del estudio farmacocinético en ratas Sprague-Dawley	45
3.8.2. Extracción de muestras sanguíneas.....	46
3.8.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS	47
3.8.3.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley.....	47
3.8.3.2. Análisis de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley.....	48

3.8.3.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley.....	49
3.8.3.4. Validación del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS.....	49
a) Recuperación y efecto matriz.....	50
b) Selectividad.....	50
3.8.4. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos derivados de aceitunas en ratas Sprague-Dawley.....	50
3.9. Efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina en la presión arterial y el peso corporal en ratas normotensas e hipertensas.....	52
3.9.1. Diseño experimental del estudio de la presión arterial.....	52
3.9.2. Efecto de una dosis única de aceitunas.....	53
3.9.3. Efecto de la ingesta diaria de aceitunas durante 49 días.....	53
3.9.4. Medición de la presión arterial.....	53
3.9.5. Extracción de muestras sanguíneas y necropsia.....	54
3.9.6. Determinación de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS.....	55
3.9.6.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR.....	55
3.9.6.2. Análisis de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR.....	56
3.9.6.3. Análisis de polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR.....	56
a) Condiciones cromatográficas.....	56
b) Condiciones de espectrometría de masas.....	56
3.9.6.4. Cuantificación de triterpenos pentacíclico, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR.....	58
3.9.6.5. Validación del método de análisis conjunto de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS.....	59

3.10. Intervención nutricional: concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en voluntarios sanos después del consumo de aceitunas de la variedad Arbequina	59
3.10.1. Diseño experimental	59
3.10.1.1. Fase 1: Estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después de la ingesta de una dosis única de aceitunas Arbequina en sujetos sanos	59
a) Sujetos de investigación	59
b) Procedimiento experimental	60
3.10.1.2. Fase 2: intervención nutricional con aceitunas durante 30 días en sujetos sanos.....	61
a) Sujetos de investigación	61
b) Procedimiento experimental	62
3.10.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos por LC-MS	63
3.10.2.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos.....	63
3.10.2.2. Análisis de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos ..	64
3.10.2.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos.....	64
3.10.2.4. Validación del método de análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS	65
3.10.3. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos derivados de aceitunas en sujetos sanos	65
3.11. Análisis estadístico	65
4. Resultados	65
4.1. Capítulo I. Estudio de los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles en las aceitunas de la variedad Arbequina y en el pienso comercial para rata.....	67

4.1.1. Determinación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016	67
4.1.1.1. Validación del método utilizado para el análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016	67
a). Precisión y exactitud	67
b) Linealidad y sensibilidad	68
c). Carry over.....	68
4.1.1.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2015-2016 por LC-MS.....	68
4.1.1.3. Concentración de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2015-2016	69
4.1.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017	70
4.1.2.1. Validación del método utilizado para el análisis triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-MS	70
a) Triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017	70
b) Polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017	71
4.1.2.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017 por LC-MS	72
a) Triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017	72
b) Polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017	73
4.1.2.3. Concentración de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017.....	74
a). Triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017	74
b) Polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017	75
4.1.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata	75
4.1.3.1. Validación del método utilizado en la determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata	75

a) Triterpenos pentacíclicos en el pienso comercial para rata	75
b) Polifenoles en el pienso comercial para rata	76
4.1.3.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata.....	77
a) Triterpenos pentacíclicos en el pienso comercial para rata	77
b) Polifenoles en el pienso comercial para rata	78
4.1.3.3. Concentración de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata.....	80
4.2. Capítulo II. Concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Arbequina	81
4.2.1. Validación del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS	81
4.2.1.1. Efecto matriz y recuperación.....	81
4.2.1.2. Precisión y exactitud.....	82
4.2.1.3. Linealidad y sensibilidad	83
4.2.1.4. Selectividad	83
4.2.1.5. Carry over	84
4.2.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS	84
4.2.2.1. Triterpenos pentacíclicos.....	84
4.2.2.2. Metabolitos del ácido maslínico	85
4.2.2.3. Metabolitos del ácido oleanólico	86
4.2.3. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después de la administración oral de aceitunas en ratas Sprague-Dawley	87
4.2.3.1. Ácido maslínico y sus metabolitos	87
a) Ácido maslínico	87
b) Metabolito monohidroxilado MMA1a.....	89

c) Metabolito monohidroxiado MMA1b	90
d) Metabolito monohidroxiado MMA1c	92
e) Metabolito monohidroxiado MMA1d	93
f) Metabolito monohidroxiado y deshidrogenado MMA2	94
g) Metabolito dihidroxiado MMA3a	94
h) Metabolito dihidroxiado MMA3b	96
i) Metabolito dihidroxiado y deshidrogenado MMA4	97
j) Metabolito monohidroxiado y deshidrogenado con adición de un ácido glucurónico MMA5	99
4.2.3.2. Ácido oleanólico y sus metabolitos	100
a) Ácido oleanólico	100
b) Metabolito monohidroxiado MOA1a	102
c) Metabolito monohidroxiado MOA1b	102
d) Metabolito monohidroxiado MOA1c	104
e) Metabolito con adición de un grupo sulfato MOA2a	105
f) Metabolito con adición de un grupo sulfato MOA2b	107
4.3. Capítulo III. Efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina en la presión arterial y el peso corporal en ratas normotensas e hipertensas	109
4.3.1. Efecto de una dosis única de aceitunas de mesa en la presión arterial en ratas	110
4.3.1.1. Presión arterial en ratas normotensas	110
4.3.1.2. Presión arterial en ratas hipertensas	111
4.3.2. Efecto de la ingesta diaria de aceitunas de mesa durante 49 días	113
4.3.2.1. Peso corporal	113
4.3.2.2. Ingesta de agua	114
4.3.2.3. Ingesta de alimento	115
4.3.2.4. Eficiencia de conversión alimenticia	116
4.3.2.5. Presión arterial en ratas normotensas	116

4.3.2.6. Presión arterial en ratas hipertensas.....	118
4.3.2.7. Necropsia.....	120
4.3.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS.....	120
4.3.3.1. Validación del método de análisis conjunto de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS.....	120
a) Triterpenos pentacíclicos.....	120
b) Polifenoles.....	120
4.3.3.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS.....	122
4.3.3.3. Identificación de polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS.....	124
4.3.3.4. Concentración de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR.....	125
4.4. Capítulo IV. Intervención nutricional: concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en voluntarios sanos después del consumo de aceitunas de la variedad Arbequina.....	127
4.4.1. Fase 1. Estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después de la ingesta de una dosis única de aceitunas Arbequina en sujetos sanos.....	127
4.4.1.1. Características de los participantes.....	127
4.4.1.2. Cantidad de triterpenos pentacíclicos consumidos por los participantes.....	127
4.4.1.3. Validación del método de análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS.....	128
a) Precisión y exactitud.....	128
b) Linealidad y sensibilidad.....	129
c) Selectividad.....	130
d) Carry over.....	130
4.4.1.4. Identificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de hombres sanos por LC-MS.....	130

a) Triterpenos pentacíclicos.....	130
b) Metabolitos del ácido maslínico	131
c) Metabolitos del ácido oleanólico.....	131
4.4.1.5. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después del consumo de aceitunas en hombres sanos	131
a) Ácido maslínico	132
b) Metabolito monohidroxilado MMA1.....	134
c) Metabolito monohidroxilado y deshidrogenado MMA2.....	135
d) Metabolito dihidroxilado y deshidrogenado MMA4	137
e) Ácido oleanólico	138
4.4.2. Fase 2. Concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos después de la ingesta de aceitunas Arbequina durante 30 días en sujetos sanos	140
4.4.2.1. Características de los participantes.....	140
4.4.2.2. Cantidad de triterpenos pentacíclicos consumidos por los participantes	141
4.4.2.3. Validación del método de análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS	141
a) Precisión y exactitud	141
b) Linealidad y sensibilidad	142
4.4.2.4. Identificación de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS	143
4.4.2.5. Concentración de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos	144
4.5. Capítulo V. Intervención nutricional: efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina sobre la presión arterial y el peso corporal en voluntarios sanos	145
4.5.1. Efecto del consumo de una dosis única de aceitunas Arbequina sobre la presión arterial en voluntarios sanos	145
4.5.2. Efecto del consumo de aceitunas Arbequina durante 30 días sobre el peso corporal y la presión arterial en voluntarios sanos	146

Índice

4.5.2.1. Efecto del consumo de las aceitunas de mesa en el peso corporal en sujetos sanos.....	146
4.5.2.2. Efecto del consumo de las aceitunas de mesa en la presión arterial en sujetos sanos.....	147
5. Discusión.....	149
6. Conclusiones.....	171
7. Bibliografía.....	175
8. Anexo	193

Figura 1.1. Historia del cultivo del olivo.....	5
Figura 1.2. Taxonomía clásica de la planta de olivo por nombre científico	7
Figura 1.3. Producción de aceitunas por región	8
Figura 1.4. Principales variedades del olivo cultivadas en España	9
Figura 1.5. Diagrama del proceso de producción de olivas	10
Figura 1.6. Estructura química del ácido maslínico	16
Figura 1.7. Estructura química del ácido oleanólico	16
Figura 1.8. Estructura química del ácido ursólico.....	17
Figura 1.9. Estructura química del eritrodíol	17
Figura 1.10. Estructura química del uvaol	17
Figura 1.11. Estructura química de la apigenina	19
Figura 1.12. Estructura química del ácido cafeico	19
Figura 1.13. Estructura química del ácido <i>p</i> -cumárico	19
Figura 1.14. Estructura química del ácido vanílico.....	20
Figura 1.15. Estructura química del catecol.....	20
Figura 1.16. Estructura química del hidroxitirosol.....	20
Figura 1.17. Estructura química del hidroxitirosol acetato	20
Figura 1.18. Estructura química de la luteolina.....	21
Figura 1.19. Estructura química de la luteolina 7- <i>O</i> -glucosido.....	21
Figura 1.20. Estructura química de la oleuropeína.....	21
Figura 1.21. Estructura química del (+)-pinosínol	22
Figura 1.22. Estructura química de la quercetina	22
Figura 1.23. Estructura química de la rutina	22
Figura 1.24. Estructura química de la salidroside	22
Figura 1.25. Estructura química del tirosol	23
Figura 1.26. Estructura química del verbascósido	23

Índice

Figura 3.1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación utilizados en la intervención nutricional	32
Figura 3.2. Procedimiento para la preparación de la suspensión de aceitunas Arbequina	34
Figura 3.3. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina	36
Figura 3.4. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata.....	45
Figura 3.5. Diseño experimental del estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos derivados de las aceitunas en ratas Sprague-Dawley	46
Figura 3.6. Extracción de triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas SD	47
Figura 3.7. Diseño experimental del estudio del efecto de las aceitunas en la presión arterial de ratas WKY y SHR	52
Figura 3.8. Metodología para medir la presión arterial	54
Figura 3.9. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR.....	55
Figura 3.10. Diseño experimental del estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos derivados de las aceitunas en sujetos sanos	60
Figura 3.11. Fase experimental de la etapa 1: obtención de muestras sanguíneas para la determinación de los triterpenos pentacíclicos en plasma y medición de presión arterial en sujetos sanos.....	61
Figura 3.12. Diseño experimental del estudio de la intervención nutricional con aceitunas en sujetos sanos	62
Figura 3.13. Fase experimental de la etapa 2: obtención de muestras sanguíneas para la determinación de los triterpenos pentacíclicos en plasma, medición de presión arterial y peso corporal en sujetos sanos	63
Figura 3.14. Extracción de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos.....	64
Figura 4.1. Cromatograma de iones totales representativo de los triterpenos pentacíclicos encontrados en las aceitunas Arbequina cosecha 2015-2016 y obtenido por LC-APCI-MS	69
Figura 4.2. Concentración de triterpenos pentacíclicos por kg de aceitunas Arbequina deshuesadas de la cosecha 2015-2016 obtenidos por LC-APCI-MS	70

Figura 4.3. Cromatograma de iones totales representativo de los triterpenos pentacíclicos encontrados en las aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017 y obtenido por LC-APCI-MS	72
Figura 4.4. Cromatogramas de iones extraídos representativos de los polifenoles encontrados en las aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017 y obtenidos por LC-ESI-MS/MS	73
Figura 4.5. Concentración de triterpenos pentacíclicos por kg de aceitunas Arbequina deshuesadas de la cosecha 2016-2017 obtenidos por LC-APCI-MS	74
Figura 4.6. Concentración de polifenoles por kg de aceitunas Arbequina deshuesadas de la cosecha 2016-2017. Los resultados fueron obtenidos por LC-ESI-MS/MS	75
Figura 4.7. Cromatograma de iones totales representativo de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el pienso comercial y obtenido por LC-APCI-MS	78
Figura 4.8. Cromatogramas de iones extraídos representativos de los polifenoles encontrados en el pienso comercial y obtenidos por LC-ESI-MS/MS	79
Figura 4.9. Cromatograma de iones totales obtenido por LC-APCI-MS de plasma blanco de rata y plasma de rata enriquecido con una mezcla de triterpenos pentacíclicos a 150 nM	84
Figura 4.10. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el plasma de las ratas Sprague-Dawley	85
Figura 4.11. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-APCI-MS de los metabolitos del ácido maslínico encontrados en el plasma de las ratas Sprague-Dawley	86
Figura 4.12. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-APCI-MS de los metabolitos del ácido oleanólico encontrados en el plasma de las ratas Sprague-Dawley	87
Figura 4.13. Concentraciones de ácido maslínico encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	87
Figura 4.14. Concentraciones de MMA1a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	89
Figura 4.15. Concentraciones de MMA1b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	91

Índice

Figura 4.16. Concentraciones de MMA1c encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	92
Figura 4.17. Concentraciones de MMA1d encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	94
Figura 4.18. Concentraciones de MMA3a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	95
Figura 4.19. Concentraciones de MMA3b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	96
Figura 4.20. Concentraciones de MMA4 encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	98
Figura 4.21. Concentraciones de MMA5 encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	99
Figura 4.22. Concentraciones de ácido oleanólico encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	101
Figura 4.23. Concentraciones de MOA1a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	102
Figura 4.24. Concentraciones de MOA1b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	103
Figura 4.25. Concentraciones de MOA1c encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	104
Figura 4.26. Concentraciones de MOA2a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	106
Figura 4.27. Concentraciones de MOA2b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas	107
Figura 4.28. Presión arterial en ratas normotensas (WKY) de 12 semanas de edad después de la administración oral de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal.	110
Figura 4.29. Presión arterial en ratas hipertensas (SHR) de 12 semanas de edad después de la administración oral de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal.	112

Figura 4.30. Evolución del peso corporal de ratas normotensas (WKY) e hipertensas (SHR) durante los 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal.	113
Figura 4.31. Presión arterial en ratas normotensas (WKY) de 14 semanas de edad después de la ingestión diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal	117
Figura 4.32. Presión arterial en ratas hipertensas (SHR) de 14 semanas de edad después de la ingestión diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal	119
Figura 4.33. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos encontrados en el plasma de los animales después del consumo diario de 3,85 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal	123
Figura 4.34. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-ESI-MS/MS de los polifenoles encontrados en el plasma de los animales después del consumo diario de 3,85 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal	124
Figura 4.35. Cromatograma de iones totales obtenido por LC-APCI-MS del plasma de los sujetos que aún no han consumido las aceitunas y plasma de los sujetos enriquecido con una mezcla de triterpenos pentacíclicos a una concentración de 500 nM	130
Figura 4.36. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el plasma de los sujetos sanos	131
Figura 4.37. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-APCI-MS de los metabolitos del ácido maslínico encontrados en el plasma de los sujetos sanos	131
Figura 4.38. Concentraciones de ácido maslínico encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas	132
Figura 4.39. Concentraciones de MMA1 encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas	134
Figura 4.40. Concentraciones de MMA2 encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas	136
Figura 4.41. Concentraciones de MMA4 encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas	137
Figura 4.42. Concentraciones de ácido oleanólico encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas	139

Índice

Figura 4.43. Cromatogramas de iones extraídos obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el plasma de los sujetos 30 días después del consumo de 60 aceitunas	143
Figura 4.44. Presión arterial después del consumo de aceitunas en sujetos sanos	145

Tabla 1.1 Información nutricional del aceite de oliva virgen extra y de las aceitunas expresados por 100 g de alimento.....	14
Tabla 3.1. Información nutricional de la porción comestible de las aceitunas Arbequina	33
Tabla 3.2. Gradiente de elución para la determinación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas cosecha 2015-2016 por LC-MS	37
Tabla 3.3. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada triterpeno pentacíclico y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-APCI-MS para el análisis en aceitunas de la cosecha 2015-2016 en el instrumento QTRAP 4000.....	37
Tabla 3.4. Gradiente de elución para la determinación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas cosecha 2016-2017 por LC-MS	40
Tabla 3.5. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada triterpeno pentacíclico y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-APCI-MS para el análisis en aceitunas de la cosecha 2016-2017 en el instrumento API3000	41
Tabla 3.6. Gradiente de elución para la determinación de polifenoles en aceitunas cosecha 2016-2017 por LC-MS	42
Tabla 3.7. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada polifenol y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-ESI-MS/MS para el análisis en aceitunas de la cosecha 2016-2017 en el instrumento API3000	43
Tabla 3.8. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada metabolito de los triterpenos pentacíclicos establecidos u obtenidos por LC-APCI-MS para el análisis en plasma de ratas SD en el instrumento QTRAP 4000.....	48
Tabla 3.9. Gradiente de elución para la determinación de polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS	56
Tabla 3.10. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada polifenol y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-ESI-MS/MS para el análisis en plasma de ratas WKY y SHR en el instrumento QTRAP 4000	57
Tabla 3.11. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada metabolito de los polifenoles establecidos u obtenidos por LC-ESI-MS/MS para el análisis en plasma de ratas WKY y SHR en el instrumento QTRAP 4000	58

Índice

Tabla 4.1. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 por LC-APCI-MS.....	67
Tabla 4.2. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 por LC-APCI-MS.....	68
Tabla 4.3. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-APCI-MS.....	70
Tabla 4.4. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-ESI-MS/MS.....	71
Tabla 4.5. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en el pienso comercial para rata por LC-APCI-MS.....	76
Tabla 4.6. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar polifenoles en el pienso comercial para rata por LC-ESI-MS/MS.....	77
Tabla 4.7. Dosis de triterpenos pentacíclicos administrados a las ratas Sprague-Dawley en el estudio farmacocinético.....	81
Tabla 4.8. Efecto matriz y recuperación en la determinación de triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS.....	82
Tabla 4.9. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-APCI-MS.....	82
Tabla 4.10. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-APCI-MS.....	83
Tabla 4.11. Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	88
Tabla 4.12. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxilado MMA1a y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	90
Tabla 4.13. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxilado MMA1b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	91

Tabla 4.14. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado MMA1c y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	93
Tabla 4.15. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxiado MMA3a y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	95
Tabla 4.16. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxiado MMA3b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	97
Tabla 4.17. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxiado y deshidrogenado MMA4 y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	98
Tabla 4.18. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado y deshidrogenado con adición de un ácido glucurónico MMA5 y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley	100
Tabla 4.19. Concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley	101
Tabla 4.20. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado MOA1b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	103
Tabla 4.21. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado MOA1c y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley	105
Tabla 4.22. Concentraciones plasmáticas del metabolito al que se le agregó un grupo sulfato MOA2a y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	106
Tabla 4.23. Concentraciones plasmáticas del metabolito al que se le agregó un grupo sulfato MOA2b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.....	108

Índice

Tabla 4.24. Dosis de triterpenos pentacíclicos y polifenoles administrados a las ratas WKY y SHR en el estudio del efecto del consumo de aceitunas en la presión arterial	109
Tabla 4.25. Efecto de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas normotensas de 12 semanas de edad	111
Tabla 4.26. Efecto de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas hipertensas de 12 semanas de edad	112
Tabla 4.27. Peso corporal de las ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal	114
Tabla 4.28. Ingesta de agua de las ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días del consumo diario de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal	115
Tabla 4.29. Ingesta de pienso de las ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días del consumo diario de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal	115
Tabla 4.30. Eficiencia de conversión alimenticia en ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal	116
Tabla 4.31. Efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal durante 49 días sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas normotensas de 14 semanas de edad	118
Tabla 4.32. Efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal durante 49 días sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas hipertensas de 14 semanas de edad	119
Tabla 4.33. Pesos relativos de los órganos y depósitos de grasa de ratas normotensas e hipertensas después de 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas Arbequina deshuesadas por kg de peso corporal	120
Tabla 4.34. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-APCI-MS	121
Tabla 4.35. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-ESI-MS/MS	122
Tabla 4.36. Concentración plasmática de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos después de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal durante 49 días en ratas normotensas y ratas hipertensas	125

Tabla 4.37. Características de los participantes antes de iniciar la intervención con 60 o 120 aceitunas de mesa	127
Tabla 4.38. Cantidad de triterpenos pentacíclicos consumidos por los sujetos en el estudio farmacocinético	128
Tabla 4.39. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de hombres sanos por LC-APCI-MS	129
Tabla 4.40. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de hombres sanos por LC-APCI-MS	129
Tabla 4.41. Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos	133
Tabla 4.42. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado MMA1 y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos	135
Tabla 4.43. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado y deshidrogenado MMA2 y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos.....	136
Tabla 4.44. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxiado y deshidrogenado MMA4 y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos.....	138
Tabla 4.45. Concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos	139
Tabla 4.46. Características de los participantes antes de iniciar la intervención nutricional con 60 aceitunas de mesa durante 30 días.....	141
Tabla 4.47. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de los sujetos sanos por LC-APCI-MS	142
Tabla 4.48. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-APCI-MS	143
Tabla 4.49. Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico y ácido oleanólico 15 y 30 días después del consumo diario de 60 aceitunas en sujetos sanos	144

Índice

Tabla 4.50. Efecto de una dosis única de 60 o 120 aceitunas sobre la presión arterial sistólica y diastólica en sujetos sanos.....	146
Tabla 4.51. Efecto de una intervención nutricional con 60 aceitunas sobre el peso corporal y el IMC en sujetos sanos.....	147
Tabla 4.52. Efecto de una intervención nutricional con 60 aceitunas sobre la presión arterial sistólica y diastólica en sujetos sanos	147

ABREVIATURAS



AMPK	Acrónimo del inglés <i>AMP-activated protein kinase</i> , quinasa activada por AMP
AKT	Acrónimo del inglés <i>protein kinase B</i> , proteína quinasa B
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
APCI	Acrónimo del inglés <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> , ionización química a presión atmosférica
AUC	Acrónimo del inglés <i>area under the curve</i> , área bajo la curva
BBCH	Acrónimo del alemán <i>Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie</i>
BEDCA	Base de Datos Española de Composición de Alimentos
CCiTUB	Acrónimo del catalán <i>Centre Científic i Tecnològic de la Universitat de Barcelona</i>
CE	Acrónimo del inglés <i>collision energy</i> , energía de colisión
CEEA	Acrónimo del catalán <i>Comitè Ètic d'Experimentació Animal</i>
CIM	Acrónimo del catalán <i>Centre d'Investigació del Medicament</i>
CM	Concentración obtenida por el método analítico
C_{max}	Concentración máxima observada que ocurre en el T _{max}
CT	Concentración nominal del analito
CV	Coefficiente de variación
CXP	Acrónimo del inglés <i>collision cell exit potential</i> , potencial de salida de la celda de colisión
DOP	Denominaciones de Origen Protegidas

Abreviaturas

DP	Acrónimo del inglés <i>declustering potential</i> , potencial de desagrupamiento
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Acrónimo del inglés <i>European Food Safety Authority</i> , Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EMA	Acrónimo del inglés <i>European Medicines Agency</i> , Agencia Europea de Medicamentos
EP	Acrónimo del inglés <i>entrance potential</i> , potencial de entrada
ERK	Acrónimo del inglés <i>extracellular signal-regulated kinases</i> , quinasa regulada por señales extracelulares
ESI	Acrónimo del inglés <i>electrospray ionization</i> , ionización por electrospray
FOO	Acrónimo del inglés <i>functional olive oil</i> , aceite de oliva funcional
FOXO3a	Proteína <i>forkhead box O3a</i>
FP	Acrónimo del inglés <i>focusing potential</i> , potencial de enfoque
GC-FID	Acrónimo del inglés <i>gas chromatography - flame ionization detector</i> , cromatografía de gases con detector de ionización de llama
HO-1	Acrónimo del inglés <i>heme oxygenase 1</i> , hemo oxigenasa 1
I	Acrónimo del inglés <i>identifier transition</i> , identificador
IGP	Indicación Geográfica Protegida
IMC	Índice de masa corporal
IS	Acrónimo del inglés <i>internal standard</i> , patrón interno
LC	Acrónimo del inglés <i>liquid chromatography</i> , cromatografía líquida

LC-APCI-MS	Acrónimo del inglés <i>liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization - mass spectrometry</i> , cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con fuente de ionización química a presión atmosférica
LC-DAD	Acrónimo del inglés <i>liquid chromatography with photodiode array detection</i> , cromatografía de líquidos acoplada a un detector de matriz de fotodiodos
LC-ESI-MS/MS	Acrónimo del inglés <i>liquid chromatography – electrospray ionization - tandem mass spectrometric</i> , cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con fuente de ionización por electrospray
LC-LTQ-Orbitrap-MS	Acrónimo del inglés <i>liquid chromatography - linear ion trap quadrupole - Orbitrap</i> , cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas híbrido compuesto de un analizador cuadrupolo de trampa de iones lineal y un Orbitrap
LC-MS	Acrónimo del inglés <i>liquid chromatography – mass spectrometry</i> , cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
LDL	Acrónimo del inglés <i>low-density lipoprotein</i> , lipoproteína de baja densidad
LOD	Acrónimo del inglés <i>limit of detection</i> , límite de detección
LOQ	Acrónimo del inglés <i>limit of quantification</i> , límite de cuantificación
MRM	Acrónimo del inglés <i>multiple reaction monitoring</i> , monitoreo de reacción múltiple
MS	Acrónimo del inglés <i>mass spectrometry</i> , espectrometría de masas
MTR	Acrónimo del inglés <i>mean time residence</i> , tiempo medio de residencia

Abreviaturas

MUFA	Acrónimo del inglés <i>monounsaturated fatty acids</i> , ácidos grasos monoinsaturados
<i>m/z</i>	Cociente masa/carga
NF-κB	Acrónimo del inglés <i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
Nrf2	Acrónimo del inglés <i>nuclear factor erythroid 2-related</i> , factor nuclear 2 derivado del eritroide
OSC	Oxidoesculeno ciclasas
p38 MAPK	Acrónimo del inglés <i>p38 mitogen-activated protein kinases</i> , proteínas quinasas p38 activadas por mitógenos
PA	Presión arterial
Q	Acrónimo del inglés <i>quantifier transition</i> , cuantificador
QTRAP	Acrónimo del inglés <i>quadropole ion trap</i> , analizador triple cuadrupolo de trampa de iones lineal
R²	Coefficiente de determinación
ROS	Acrónimo del inglés <i>reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
SD	Sprague-Dawley
SHR	Acrónimo del inglés <i>spontaneously hypertensive rats</i> , ratas espontáneamente hipertensas
SIM	Acrónimo del inglés <i>selected ion monitoring</i> , monitoreo de iones seleccionado
TIC	Acrónimo del inglés <i>total ion chromatogram</i> , cromatograma de iones totales

T_{max}	Tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima del compuesto
TNFα	Acrónimo del inglés <i>tumor necrosis factor α</i> , factor de necrosis tumoral α
ua	Unidades arbitrarias
UGT	UDP-glicosiltransferasas
UPLC	Acrónimo del inglés <i>ultra high performance liquid chromatography</i> , cromatografía líquida de alta eficacia
USDA	Acrónimo del inglés <i>United States Department of Agriculture</i> , Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
WKY	Wistar Kyoto
XIC	Acrónimo del inglés <i>extracted ion chromatogram</i> , cromatograma de iones extraídos

RESUMEN DE LA TESIS



Las aceitunas son una fuente dietética importante de compuestos bioactivos, entre los que destacan los triterpenos pentacíclicos. A estos componentes se les ha atribuido importantes propiedades beneficiosas para la salud, lo que ha justificado realizar un estudio utilizando diferentes modelos animales y voluntarios sanos para conocer el efecto producido por la ingesta de aceitunas. En esta tesis, se ha profundizado en diferentes aspectos sobre la farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y el efecto de este alimento sobre la presión arterial. Se eligió la variedad de Arbequina como aceituna de mesa a estudiar debido a su elevada producción y consumo en Cataluña y sus compuestos triterpénicos pentacíclicos se analizaron por LC-APCI-MS. Los triterpenos determinados fueron identificados como ácido maslínico, ácido oleanólico y eritrodiol, constituyendo aproximadamente un 73, 26 y 1%, respectivamente. A continuación, se realizó una administración única a ratas Sprague-Dawley a las dosis de 3,85 y 7,70 g/kg, equivalentes al consumo en humanos de 30 y 60 aceitunas, y se determinaron las concentraciones plasmáticas de estos componentes. El análisis reveló que el eritrodiol no se detectaba en plasma mientras que si lo hacían los ácidos maslínico y oleanólico, junto a diversos metabolitos de fase I y II de ambos compuestos. Los principales parámetros farmacocinéticos estimados según un modelo no compartimental indicaron que, para las dos dosis de aceitunas, la T_{max} de ambos triterpenos coincidía a las 6 horas después de la administración mientras que las C_{max} fueron aproximadamente de 50 nM para el ácido maslínico y de 3,5 nM para el oleanólico a la dosis inferior y de 110 y 11,6 nM a la dosis superior. Además, se identificaron y cuantificaron 9 metabolitos del ácido maslínico y 5 metabolitos para el ácido oleanólico. En tercer lugar, se evaluó el efecto de la administración de 3,85 g de aceitunas/kg en la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas y sus controles normotensos. Los resultados indicaron que tanto la ingesta de una dosis única, como la diaria durante 49 días, no modifican la presión arterial de las ratas normotensas. En cambio, tienen un efecto hipotensor en las ratas hipertensas, alcanzando reducciones de la presión arterial sistólica y diastólica de aproximadamente 15 mm Hg en ambos estudios. Finalmente, se efectuó una intervención nutricional cruzada, aleatorizada y abierta en voluntarios sanos. En una primera fase, se realizó un estudio farmacocinético en el que los voluntarios ingerían una dosis única de 60 o 120 aceitunas. Los resultados indicaron la presencia en plasma de los ácidos maslínico y oleanólico con un patrón diferente que en el modelo animal puesto que estos triterpenos alcanzaban la T_{max} a un tiempo menor y daban lugar a un número de metabolitos inferior. En una segunda fase, los voluntarios sanos consumieron 60 aceitunas (30 en el almuerzo y 30 en la cena) durante 30 días. La determinación de los compuestos triterpénicos 12 h después de la última ingesta indicó la presencia de ácido maslínico (300 nM) y oleanólico (11 nM). Referente al efecto de la ingesta única de aceitunas en la presión arterial en voluntarios, se encontró un descenso de la presión sistólica de aproximadamente 9 mm Hg desde los 30 min hasta las 8 h, sin efecto sobre la diastólica. Sin embargo, en la intervención a largo plazo no se

Resumen

observaron cambios en la presión arterial. En conclusión, en esta tesis se aportan nuevos datos sobre la farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos aportados por la ingesta de aceitunas, además de presentar evidencias científicas sobre el efecto de este alimento en la presión arterial, lo que podría sentar las bases para futuras recomendaciones dietéticas de las aceitunas como un alimento funcional.

Table olives are an important dietary source of bioactive compounds, among which pentacyclic triterpenes stand out. The important beneficial health properties which have been attributed to these components have justified conducting a study using different animal models and healthy volunteers to understand the effect produced by the intake of table olives. The present thesis investigates different aspects of the pharmacokinetics of pentacyclic triterpenes and the effect of this food on blood pressure. The Arbequina variety was selected due to its high production and consumption in Catalonia and its pentacyclic triterpene compounds were analyzed by LC-APCI-MS. Such triterpenes were identified as maslinic acid, oleanolic acid and erythrodiol, constituting approximately 73, 26 and 1%, respectively. Subsequently, a single administration of table olives on Sprague-Dawley rats was performed at the doses of 3.85 and 7.70 g/kg, equivalent to the human consumption of 30 and 60 table olives, and the plasma concentrations of these components were determined. The analysis revealed that erythrodiol was not detected in plasma while maslinic and oleanolic acids were identified along with various phase I and II metabolites of both compounds. The main pharmacokinetic parameters estimated according to a non-compartmental model indicated, for the referred two doses of table olives, that the T_{max} of both triterpenes coincided at 6 hours after administration, while the C_{max} of maslinic and oleanolic acid were approximately 50 and 3.5 nM at the lower dose and 110 and 11.6 nM at the higher dose. Additionally, 9 metabolites of maslinic acid and 5 metabolites for oleanolic acid were identified and quantified. Thirdly, the effect of the administration of 3.85 g of table olives/kg on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats and their normotensive controls was evaluated. The results indicated that both, the intake of a single dose and a daily dose for 49 days, did not modify the blood pressure of the normotensive rats. Conversely, they have a hypotensive effect on hypertensive rats, achieving reductions in systolic and diastolic blood pressure of about 15 mm Hg in both studies. Finally, a randomized, open-label, two-way crossover nutritional intervention was carried out in healthy volunteers. In a first phase, a pharmacokinetic study was performed in which the volunteers ingested a single dose of 60 or 120 table olives. The results indicated the presence of the maslinic and oleanolic acids in plasma with a different pattern than the animal model since these triterpenes reached the T_{max} at a shorter time and presented a lower number of metabolites. In a second phase, the healthy volunteers consumed 60 table olives (30 at lunch and 30 at dinner) for 30 days. The determination of the triterpenic compounds 12 h after the last ingestion indicated the presence of maslinic acid (300 nM) and oleanolic acid (11 nM). Regarding the effect of a single intake of table olives on blood pressure in volunteers, a decrease in systolic blood pressure of approximately 9 mm Hg was found from 30 min to 8 h, with no effect on diastolic blood pressure. However, in the long-term intervention, no changes in blood pressure were observed. In conclusion, this thesis provides new insights about the pharmacokinetics of the pentacyclic triterpenes provided by the intake of table olives, in addition to present scientific evidence of the effect of this food on blood pressure, which could lay the basis for future dietary recommendations of table olives as a functional food.

I. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. El olivo

1.1.1. Evolución histórica del cultivo del olivo

El olivo cultivado (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* L.) y el olivo salvaje denominado acebuche (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* L.) son árboles versátiles que han sido utilizados como fuente de alimento, madera y forraje en las culturas mediterráneas (Besnard *et al.*, 2018). Recientemente, se han descrito tres etapas en la evolución de la explotación del olivo: en el Neolítico (~9200-8500 AP) como leña o material de construcción; en el periodo Neolítico tardío (~7500-7000 AP) como aceite de oliva; y, por último, durante el Calcolítico Medio (~6600 AP) con la producción de aceitunas (Galili *et al.*, 2021).

La expansión del olivo por el mundo acompaña a la historia migratoria de los fenicios, griegos y los romanos (Diez *et al.*, 2015). En el año 1050 a.C., los patrones de comercio y asentamiento de los fenicios fomentaron que el cultivo del olivo se desarrollara desde el Levante (Israel, Siria, Líbano y Palestina) hasta la península Ibérica (especialmente España) y norte de África (Martínez *et al.*, 2006; Breton *et al.*, 2012). No obstante, los restos de semilla de acebuche encontrados en yacimientos arqueológicos sugieren que en España ya se utilizaba el olivo antes de la llegada de los fenicios (Martínez *et al.*, 2006) (Figura 1.1).



Figura 1.1. Historia del cultivo del olivo. Modificado de Diez *et al.* (2015).

Introducción

Aparentemente, la olivicultura se introdujo en Grecia desde Creta. En esta región, se mejoraron las técnicas agrícolas y aceiteras aumentando la plantación de olivos desde el siglo VIII a.C. hasta el siglo V a.C. (Mataix y Barbancho, 2007). A partir del siglo IV a.C., el cultivo de *Olea europaea* L. adquirió relevancia en la cultura helénica (Martínez *et al.*, 2006) y el olivo formó parte fundamental de la economía y el comercio, de la religión y de la mitología, así como de la alimentación y la medicina (Mataix y Barbancho, 2007). El imperio romano vio llegar el aceite de oliva desde las colonias griegas, convirtiéndose en cultivo y componente importante de la alimentación, alcanzando su apogeo a lo largo del siglo III d.C. (Mataix y Barbancho, 2007). El aceite de oliva también se empleó como ungüento, medicamento, perfume, cosmético, aceite hidratante, lubricante y como aceite de lámpara. Además, los productos generados a partir de la extracción del aceite se usaron como combustible, fertilizante o alimento animal y la madera se usó como material de construcción (Kaniewski *et al.*, 2012). La cultura romana intensificó y expandió el cultivo del olivo, propiciando un avance significativo de la oleicultura (Mataix y Barbancho, 2007; Kostelenos y Kiritsakis, 2017). De esta manera, recipientes de cerámica que se utilizaban como contenedores de aceite de oliva, están ampliamente presentes por toda la cuenca mediterránea (Breton *et al.*, 2012), entre los cuales se encuentran los restos de instalaciones destinadas a la fabricación de aceite en las villas romanas asentadas en el Baix Penedés, Reus y el litoral de Girona que datan de los siglos II a IV d.C (Tous y Romero, 1993).

Después de la caída del imperio romano en la Edad Media, el desarrollo agrícola y por lo tanto la olivicultura decreció en el Mediterráneo Occidental (Martínez *et al.*, 2006). Se habla de una regresión general durante los siglos X y XI que se superaría a finales del siglo XIII y culminaría en el siglo XIV con un aumento de la producción de aceite y una dominancia del olivo en el paisaje (Mataix y Barbancho, 2007). Se cree que en el siglo XV el duque de Medinaceli procedente de Oriente Próximo introdujo la variedad Arbequina en la baronía de Arbeca en la comarca catalana de les Garrigues (Lleida). Sin embargo, datos recientes sugieren que fue un miembro del linaje de los Cardona quien trajo esta variedad desde el Oriente Próximo y escogió Arbeca para probar su cultivo (Ninot *et al.*, 2019). Lo cierto es que el XI duque de Medinaceli (siglo XVIII) prometió un real de vellón por cada olivo plantado para impulsar su cultivo, aunque no hay constancia de que nunca se llegará a realizar dicho pago (Ninot *et al.*, 2019). A principios del siglo XVI, el olivo fue introducido por los colonizadores y monjes españoles en América del Sur (Colombia y Perú) y más tarde a la costa oeste de los Estados Unidos (Breton *et al.*, 2012). Los misioneros católicos españoles extendieron su cultivo por todo el continente americano (Breton *et al.*, 2012). Posteriormente, en el siglo XIX, se registró un aumento de la producción de aceite de oliva en Italia y España, motivado en parte, por la demanda industrial de este alimento por otros países (Colomba, 2017). El cultivo del olivo se introdujo en

Sudáfrica después de la colonización Boer, se incorporó a Australia en 1812, y posteriormente, a China y Japón (Breton *et al.*, 2012).

En las tres primeras décadas del siglo XX incrementó el cultivo del olivo en todas las provincias españolas (Colomba, 2017). Este crecimiento fue resultado de la adaptación natural del cultivo, la industrialización y la modernización de la agricultura. Además, el reemplazo del uso de grasa animal por aceite vegetal y las investigaciones sobre los beneficios del consumo de aceite de oliva realizadas desde 1970, impulsaron la olivicultura en España (Infante-Amte, 2012). Actualmente, el olivo se utiliza para la producción de aceite y aceitunas. En España, la calidad de estos productos ha derivado en el registro de 29 Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) para los aceites de oliva extra virgen y dos más para aceitunas naturales (European Commission, 2020). Por otra parte, las hojas se han utilizado en nutrición y medicina debido principalmente a su alto contenido de compuestos bioactivos (Guo *et al.*, 2018).

1.1.2. Características del olivo

1.1.2.1. Taxonomía

El olivo pertenece a la familia Oleaceae (Figura 1.2), la cual contiene alrededor de 30 géneros y 180 especies (Tsantili *et al.*, 2017). Dentro de la especie *Olea europaea* L. encontramos 6 subespecies; la *ssp. europaea* en la cuenca mediterránea; la *ssp. guanchica*, la *ssp. cerasiformis* y la *ssp. maroccana* en Macaronesia (Azores, Canarias, Cabo Verde, Madeira e islas Salvajes); la *ssp. laperrinei* en las montañas del Sahara y la *ssp. cuspidata* al sur de África y Asia (Sebastiani y Busconi, 2017).

Reino: Plantae Subreino: Tracheobionta Superdivision: Spermatophyta Division: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Subclase: Asteridae Orden: Scrophulariales Familia: Oleaceae Género: <i>Olea</i> L. Especie: <i>Olea europaea</i> L. Subespecie: <i>Olea europaea</i> L. <i>ssp. europaea</i>
--

Figura 1.2. Taxonomía clásica de la planta de olivo por nombre científico (Tsantili *et al.*, 2017).

1.1.2.2. Ecología y descripción botánica

Olea europaea L. es un árbol pequeño y longevo, crece entre 8-15 metros de altura y puede vivir más de 1000 años. El tronco, que es corto y grueso, desarrolla múltiples ramas que, a su vez se despliegan en ramas más pequeñas en forma de cascada. Las hojas de color verde plateado son gruesas y coriáceas. Es una especie termófila, típica de la vegetación mediterránea, adaptada para tolerar sequía, suelos pobres y estrés de salinidad (Guerrero *et al.*, 2016). Las flores que aparecen a principios de la primavera

Introducción

son hermafroditas, de color blanco y pequeñas (Raina, 2003). El fruto es una drupa que, en plena madurez, es de color negro violáceo. Su tamaño es de 2-2,5 cm de largo y su peso de entre 1,5 a 13 g. Además, posee una parte central llamada endocarpio donde se encuentra la semilla rodeada por el mesocarpio o pulpa y, por último, esta se encuentra cubierta por el epicarpio (Guerrero *et al.*, 2016; Tsantili *et al.*, 2017).

El proceso de crecimiento y maduración de la oliva es de aproximadamente 5 meses (Ghanbari *et al.*, 2012). El estado de floración y fructificación del olivo se puede evaluar por varios métodos, entre ellos se encuentra el uso de la escala fenológica de la BBCH (*Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*), la cual emplea una escala del 0 al 9 para valorar las principales fases del ciclo anual del olivo. Los estadios del 0 al 6, se presentan de marzo a noviembre y se caracterizan por el desarrollo de las hojas y las flores. En el estadio 7, de mayo a octubre, se presenta el desarrollo de la oliva hasta llegar al tamaño final adecuado para obtener aceitunas verdes. La maduración de la fruta ocurre en el estadio 8, de septiembre a diciembre, que termina con la cosecha de la oliva para la obtención de aceite o su uso como aceitunas. Por último, en el estadio 9, ocurre la senescencia del fruto (Sanz-Cortés *et al.*, 2002).

1.1.2.3. Distribución del cultivo de oliva en la actualidad

Actualmente, el olivo se ha cultivado con éxito en todo el mundo con una extensión de 10,5 millones de hectáreas bajo cultivo y una producción internacional de 21,1 millones toneladas de oliva (FAO, 2017). De la totalidad de la oliva recolectada, aproximadamente un 90% se destina a la elaboración de aceite y solamente un 10% se dedica a la producción de aceitunas (Picornell y Melero 2013).

Europa es el principal productor de olivas, seguido de África, Asia, América y Oceanía (Figura 1.3) (FAO, 2017). En España e Italia se encuentran el 55% y 23% de los olivares de la Unión Europea; seguidos de Grecia y Portugal con el 15% y el 7%, respectivamente. Los otros estados miembros de la Unión Europea poseen una pequeña parte de la superficie total de olivos con alrededor del 1% (European Commission, 2018). En Catalunya, el 15%

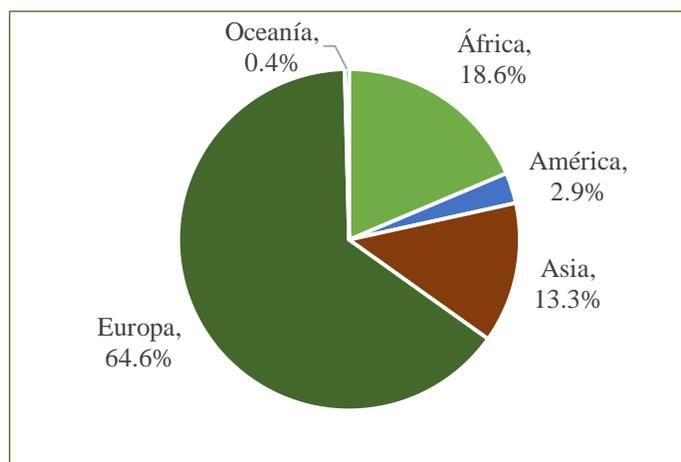


Figura 1.3. Producción de aceitunas por región (FAO, 2018).

de la superficie agrícola se destina al cultivo del olivo principalmente en las comarcas Les Garrigues, el Baix Ebre y Montsià (Ninot *et al.*, 2019).

1.1.2.4. Principales variedades de olivo

El Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) estima que el Banco Mundial de Germoplasma de Oliva de Córdoba cuenta con el registro de más de 900 variedades provenientes de 28 países diferentes (IFAPA 2018). Esta colección fue iniciada en 1970 por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en colaboración con el Gobierno Español con el objetivo de documentar, salvaguardar y facilitar la utilización de todas las variedades de olivo cultivadas en el mundo (Caballero y Del Rio 2008). En un principio, la caracterización de las variedades se realizó de acuerdo con una serie de criterios agronómicos básicos como la morfología; en la actualidad, esta caracterización también se lleva a cabo mediante estudios genéticos de marcadores moleculares (Trujillo *et al.*, 2013).

En España se han identificado 262 variedades de olivo, de estas, 23 se consideran como principales. Entre ellas tenemos a las variedades Manzanilla de Sevilla, Gordal Sevillana, Hojiblanca, Manzanilla Cacereña y Aloreña (Barranco y Rallo 2000). Por otra parte, Catalunya posee una de las mayores reservas de olivo de España (Tous y Romero, 1993). Desde 1987 el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) trabaja en el registro del Banco de Germoplasma de variedades catalanas de olivo en el Centro de Mas Bové (Constantí, Tarragona), en donde hasta el momento, se han identificado 81 perfiles que demuestran una riqueza genética notable para el tamaño del territorio (Ninot *et al.*, 2019). Se estima que más del 85% de los olivos de Catalunya pertenecen a las siguientes cuatro variedades: Arbequina, Empeltre, Picudo y Sevillana. De estas, la variedad Arbequina representa cerca del 50% de la superficie cultivada de olivo (Generalitat de Catalunya, 2015) (Figura 1.4).

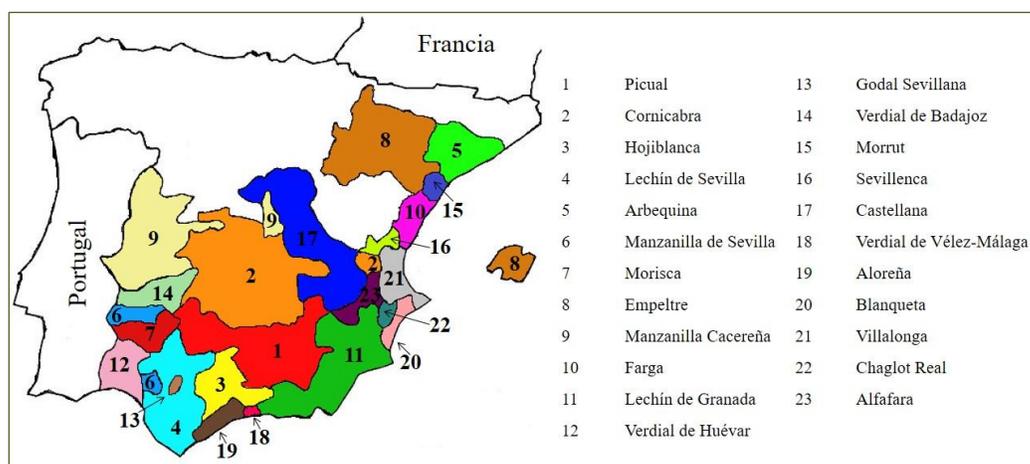


Figura 1.4. Principales variedades del olivo cultivadas en España (Barranco y Rallo 2000).

Introducción

1.1.2.5. Consumo de la oliva

El aceite de oliva y las aceitunas son los principales productos obtenidos de *Olea europaea* L. Los mayores consumidores de aceite de oliva son los ciudadanos griegos con 16,3 kg *per cápita*. España, ocupa la segunda posición con una ingesta de 10,4 kg *per cápita*. El consumo en Francia y los EUA es de alrededor de 1 kg *per cápita*. Sin embargo, el consumo de aceite de oliva representa solo el 3% del consumo mundial de grasa, mientras que el aceite de palma representa el 38% (European Commission, 2019).

Aproximadamente el 70% del consumo de las aceitunas se concentra en 10 países, principalmente los países productores. Entre ellos tenemos a España, Italia, Egipto, Argelia y Turquía. El consumo estimado de aceitunas *per cápita* en España es de 4,1 kg por año; sin embargo, el consumo estimado a nivel mundial es bajo, de entre 0,7 y 7,2 kg *per cápita*. No obstante, las oportunidades de crecimiento en este sector han incrementado en los últimos cinco años, ya que el consumo total de aceitunas ha aumentado casi un 10% a nivel mundial (European Commission, 2019; IOC 2019).

1.1.3. Las aceitunas

1.1.3.1. Proceso para la elaboración de aceitunas

Las aceitunas son un producto preparado a partir de los frutos sanos de *Olea europaea* L., estos son tratados para disminuir su amargor y preservados por fermentación natural o por tratamiento térmico, con o sin la adición de conservantes (FAO, 2004). Recientemente, se ha descrito que las primeras elaboraciones de las aceitunas se realizaron en las costas de Israel y el mar Mediterráneo sirvió como fuente de agua de mar y sal necesarias para disminuir el amargor del fruto (Galili *et al.*, 2021). Actualmente, el proceso para la elaboración de aceitunas comienza con la cosecha y el transporte de las olivas. Para evitar el daño del fruto, se prefiere cosechar las olivas manualmente. El tiempo de cosecha de la oliva

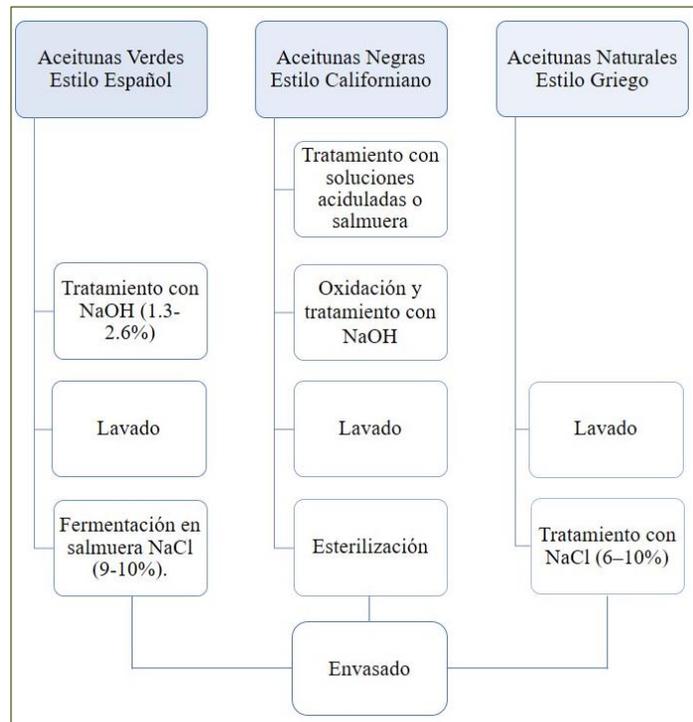


Figura 1.5. Diagrama del proceso de producción de olivas (Guo *et al.*, 2018).

depende del método con el cuál el fruto se procesará posteriormente (Kiritsakis *et al.*, 2010). Así, las aceitunas se pueden clasificar de acuerdo con el índice de pigmentación de las olivas frescas en: aceitunas verdes (cosecha temprana), aceitunas de color cambiante y aceitunas negras (cosecha tardía) (Rejano *et al.*, 2010). Las aceitunas deben ser transportadas cuidadosamente en contenedores pequeños y con suficiente ventilación hasta la instalación de procesamiento, el cual, debe comenzar lo antes posible (Boskow *et al.*, 2015).

Los objetivos del tratamiento de las olivas frescas son mejorar las características sensoriales, garantizar la seguridad del consumo y disminuir la presencia de oleuropeína, responsable del sabor amargo. Así, existen numerosos métodos de procesamiento de olivas que dependen de la variedad de aceituna, grado de madurez, y factores culturales y tradicionales (Boskow *et al.*, 2015). Entre ellos, destacan los estilos comerciales: aceitunas verdes estilo español, aceitunas negras estilo californiano y aceitunas naturales estilo griego (Figura 1.5) (Guo *et al.*, 2018).

1.1.3.2. Estilos comerciales de aceitunas

El consumo de aceitunas precisa de un tratamiento previo a su comercialización. Entre ellos caben destacar tres que se resumen a continuación:

- Aceitunas verdes estilo español. Las olivas verdes son cosechadas cuando han alcanzado el tamaño deseado y antes del cambio de color. Posteriormente, se tratan en una solución de NaOH (Campus *et al.*, 2018). El álcali es eliminado con numerosos y prolongados lavados para después cubrir las aceitunas con salmuera. La salmuera original se reemplaza por una nueva y las aceitunas se embalan en su recipiente. El producto final presenta niveles de acidez libre (0,5-0,7%), NaCl (5-7%) y un pH menor a 3,5 (Rejano *et al.*, 2010).
- Aceitunas negras estilo californiano. Se producen a partir de olivas cosechadas en la etapa de coloración verde-amarillo, las cuales se depositan en soluciones aciduladas o en salmueras. Las aceitunas se oxidan en contenedores en el que el aire a presión burbujea uniformemente en la solución. Este método es intercalado con tratamientos con soluciones diluidas de NaOH. Por último, las aceitunas se lavan con agua, se colocan en salmuera y se esterilizan (Campus *et al.*, 2018). El producto final presenta un contenido de NaCl (1-3%) y un pH de entre 5,8 y 7,9 (Rejano *et al.*, 2010).
- Aceitunas naturales estilo griego. Se cosechan cuando tienen una coloración verde-amarillo o cuando están completamente maduras. Después del lavado y clasificado, las olivas se sumergen en soluciones de NaCl, en las cuales la fermentación se lleva a cabo principalmente debido al metabolismo de la microbiota autóctona (Campus *et al.*, 2018). Posteriormente, las aceitunas son

Introducción

sumergidas en 8% de salmuera fresca antes del embalaje para obtener un producto final con niveles de acidez libre (0,3%), NaCl (5%) y un pH de 4,3 (Rejano *et al.*, 2010).

1.1.3.3. Aceitunas con Denominación de Origen Protegida

Actualmente, las aceitunas de origen español cuentan con 2 DOP; la Aceituna de Mallorca y la Aceituna Aloreña de Málaga. En ambos casos, las aceitunas se procesan en salmuera sin el uso de NaOH, por lo tanto, se pueden comercializar como aceitunas naturales estilo griego. Además, se encuentra en solicitud para obtener la Indicación Geográfica Protegida (IGP), las variedades de aceitunas Manzanilla y Godal de Sevilla que son elaboradas siguiendo el estilo español. Estas nuevas IGP podrían proteger alrededor del 30-40% de las aceitunas españolas y así valorizar las aceitunas en el futuro (Romero *et al.*, 2018; European Commission, 2020).

1.1.3.4. La aceituna de la variedad Arbequina

La variedad Arbequina es la más extendida en Catalunya. Constituye la base de la DOP Aceite Siurana, que engloba casi la totalidad del Camp de Tarragona y del Baix Penedès y algunos municipios de la Ribera d'Ebre. El cultivo de la variedad Arbequina se adapta a terrenos pobres, es resistente al frío y su copa reducida le permite mayores densidades de plantación en comparación con otros cultivares. Lo anterior, permite que sea una variedad muy productiva. Su fruto es pequeño, con un peso medio de 1,89 g. En estado de maduración, adquiere una coloración negra y un rendimiento graso del 20-22%. Esta variedad es reconocida como una de las mejores para la obtención de aceite, el cuál es estimado por sus buenas características organolépticas (Tous y Romero, 1993; Ninot *et al.*, 2019). Ejemplo de ello es que la variedad predominante en el Camp de Tarragona es la Arbequina. Además, la DOP Aceite de Les Garrigues en Lleida, reconocida desde los años 70, basa su producción en las variedades Arbequina y Verdiell. Finalmente, la reciente DOP Aceite del Empordà creada en el 2008, tiene como variedad autorizada a la Arbequina, entre otras (Ninot *et al.*, 2019).

1.1.4. Composición nutricional de *Olea europaea* L.

1.1.4.1. Las hojas del olivo

La composición de las hojas de olivo incluye ácidos grasos, principalmente el ácido linolénico (C18:3) del 30 al 42%, seguido del ácido oleico (C18:1) del 18 al 22% y del ácido palmítico (C16:0) del 18 al 22% (Bahloul, 2014). También contienen aminoácidos como arginina, leucina, prolina, glicina, valina y alanina; además de pequeñas cantidades de cisteína, metionina y lisina (Kiritsakis *et al.*, 2017). La concentración de azúcares depende de la variedad del cultivar y menos del 60% de los carbohidratos

solubles corresponden al manitol, glucosa, fructosa y galactosa (Gómez-González *et al.*, 2010). Respecto a los micronutrientes, las hojas del olivo son una fuente importante de calcio (9,25-10,39 mg/g de materia seca), potasio (4,47-9,14 mg/g de materia seca) (Bahloul, 2014), β -caroteno y α -tocoferol (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2017). Además, contienen muchos compuestos potencialmente bioactivos como el compuesto fenólico oleuropeína, que puede constituir hasta 6–9% de materia seca en las hojas (Sedef and Karakaya, 2009). En la hoja del olivo, la abundancia y el perfil de los triterpenos cambian durante su ontogenia. En general, el ácido oleanólico representa del 3-3,5% del peso seco, el ácido maslínico constituye del 0,5-0,75%, el ácido ursólico del 0,2-0,25% y el eritrodiol y el uvaol del 0,05-0,15% (Guinda *et al.*, 2010). Los polifenoles se han detectado en cantidades importantes, de 44–180 g/kg. Entre ellos, el fenol principal es la oleuropeína, la cual representa del 74-94% de los fenoles totales (Medina *et al.*, 2019).

1.1.4.2. Las olivas

El fruto de *Olea europaea* L. se utiliza para producir dos alimentos representativos de la dieta mediterránea tradicional; el aceite de oliva y las aceitunas. Los principales componentes de la pulpa de la oliva fresca son el agua (50%), lípidos (22%), carbohidratos (19,1%), celulosa (5,8%), compuestos fenólicos (1-3%), proteínas (1,6%) y sustancias inorgánicas (1,5%) (Ghanbari *et al.*, 2012). El contenido de ácidos grasos, predominantemente monoinsaturados (MUFA) como el ácido oleico, es elevado en comparación con otras drupas; sin embargo, la cantidad de azúcares es baja. La composición depende de la variedad y el tiempo de cosecha (Guo *et al.*, 2018). El ácido glutámico, el ácido aspártico, la arginina y la fenilalanina son usualmente los principales aminoácidos encontrados en varios frutos de oliva, seguido de la leucina y valina (Paiva-Martins and Kiritsakis, 2017). Por otra parte, las olivas también contienen apreciables cantidades de vitaminas, minerales, flavonoides y antocianinas (Guo *et al.*, 2018). El contenido de triterpenos de algunas variedades como la Picual y la Arbequina es de alrededor de 3 g/kg concentrados principalmente en el epicarpio. La cantidad de compuestos fenólicos en las olivas también es importante (35 g/kg) y particularmente destaca la presencia de la oleuropeína y la demetiloleuropeína (Romero *et al.*, 2017).

1.1.4.3. Las aceitunas

El tipo de procesamiento de la oliva tiene gran influencia en la concentración de los nutrientes y los compuestos bioactivos; siendo la aceituna y el aceite de oliva diferentes en su composición química y nutricional. La información nutricional del aceite de oliva extra y de las aceitunas según la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) se muestran en la Tabla 1.1.

Introducción

Tabla 1.1 Información nutricional del aceite de oliva virgen extra y de las aceitunas expresados por 100 g de alimento.

	BEDCA		USDA	
	AOVE	Aceitunas	AOVE	Aceitunas ^a
Energía total (kcal)	888	120	884	124
Lípidos totales (g)	100	12,5	100	12,1
Proteína total (g)	Traza	1,3	0	0,9
Hidratos de carbono (g)	0	1,0	0	5,5
Fibra dietética total (g)	0	4,8	0	3,2
Ácidos Grasos Monoinsaturados totales (g)	78,2	8,7	73,0	8,9
Ácidos Grasos Poliinsaturados totales (g)	7,5	0,6	10,5	1,0
Ácidos Grasos Saturados totales (g)	14,2	2,6	13,8	1,6
Vitamina A (µg)	34	48	0	20
Vitamina E (mg)	18,3	1,48	14,4	2,3
Folatos (µg)	Traza	10,4	0	3
Sodio (mg)	Traza	54	2	981
Calcio (mg)	Traza	64	1	77
Potasio (mg)	Traza	432	1	18

AOVE, aceite de oliva virgen extra. ^a Aceitunas naturales procesadas según el estilo griego.

Las aceitunas son un alimento de gran valor nutricional, con un valor calórico promedio de 6,25 cal/g. Su pulpa contiene un porcentaje variable de agua que depende del procesamiento (14-62%) (Khan *et al.*, 2015). El contenido de MUFAs es de 75-85%, siendo el ácido oleico el predominante (63-81%), seguido del ácido palmítico (10-20%), el ácido linoleico (5-14%) y el ácido esteárico (2-3%). La cantidad de proteínas es baja (1,0-2,2%), sin embargo, la calidad nutricional es alta debido a la presencia de aminoácidos esenciales como treonina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y lisina, además de ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, histidina y tirosina. La concentración de carbohidratos también es baja y depende del procesamiento de las aceitunas, las aceitunas sin fermentar pueden tener apreciables cantidades de azúcares simples de aproximadamente 4% (Lanza 2012; Khan *et al.*, 2015). Además, las aceitunas son una buena fuente de fibra dietética, al aportar aproximadamente 3 g/100 g (Boskou, 2017). El contenido de minerales comprende del 3-7%, entre ellos destacan el sodio, calcio y potasio (Khan *et al.*, 2015). Las aceitunas también proporcionan vitamina E (13-52 mg/kg), pequeñas cantidades de vitaminas del complejo B (tiamina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina) y β-caroteno (Boskou, 2017). La adición de ácido ascórbico como antioxidante, puede presentar a las aceitunas como una interesante fuente de vitamina C (Kailis y Kiritsakis, 2017); además de que este alimento podría utilizarse como vehículo para incorporar probióticos, agregando características funcionales a sus

propiedades nutricionales actuales (Lanza 2012; Guo *et al.*, 2018). En la pulpa de aceitunas naturales, se ha reportado una cantidad promedio de 1441,3 mg/kg de triterpenos de los cuales destaca la presencia de ácido maslínico (Medina *et al.*, 2012), además de alrededor de 1200 mg/kg de compuestos fenólicos. Dentro de ellos, el hidroxitirosol y el tirosol son los más representativos (Romero *et al.*, 2004).

1.2. Compuestos bioactivos en las aceitunas: triterpenos pentacíclicos y polifenoles

1.2.1. Triterpenos pentacíclicos

1.2.1.1. Síntesis de triterpenos pentacíclicos

La diversidad estructural de los triterpenos se debe a la gran cantidad de enzimas implicadas en la biosíntesis de los mismos. En la formación de triterpenos, el precursor isoprenoide 2,3-oxidoescualeno es ciclado por las enzimas oxidoescualeno ciclasas (OSC). Posteriormente, estas estructuras son oxigenadas por varios citocromos P450 y finalmente glicosiladas por UDP-glicosiltransferasas (UGT). Los genomas de las plantas contienen aproximadamente una docena de OSC, aproximadamente 250 P450 y aproximadamente 110 UGT, con lo cual, se puede crear una extensa cantidad de triterpenos (Cárdenas *et al.*, 2019).

Los triterpenos se clasifican en función del número y la organización estructural de los carbonos formados por la disposición lineal de las unidades de isopreno seguidas de la ciclación y reordenamiento del esqueleto de carbono (Ludwiczuk *et al.*, 2017). Entre ellos podemos mencionar a los triterpenos pentacíclicos, los cuales son compuestos con un esqueleto de 30 carbonos agrupados en 5 ciclos de 6 carbonos. Estas moléculas se sintetizan a partir de unidades de isopreno activo a través de la vía citoplasmática de acetato/mevalonato. La condensación de seis moléculas de isopreno activo (2,3-oxidoescualeno) puede ser llevado a cabo por varias triterpeno ciclasas, entre ellas la β -amirina sintasa. Esta enzima cataliza la producción del primer triterpenoide pentacíclico de esta vía, la β -amirina, de la cual se derivan posteriormente otros triterpenos como el eritrodiool, el ácido oleanólico y el ácido maslínico. La α -amirina es otro triterpenoide pentacíclico producido por la ciclación del 2,3-oxidoescualeno a partir de la cual se sintetizan uvaol y ácido ursólico sucesivamente (Stiti *et al.*, 2007).

1.2.1.2. Triterpenos pentacíclicos en *Olea europaea* L.

Los triterpenos pentacíclicos se encuentran en todas las partes del olivo, una de las plantas con mayor contenido de triterpenos (Stiti y Hartmann, 2012). Los triterpenoides pentacíclicos α y β -amirina y sus derivados, se producen especialmente en los recubrimientos cerosos de las hojas y los frutos (Ludwiczuk *et al.*, 2017). En el caso del fruto, el contenido de triterpenos depende del estado de

Introducción

desarrollo del cultivo y de la variedad del mismo; sin embargo, las drupas contienen constantemente altas cantidades de α y β -amirinas. Independientemente de la etapa de desarrollo, los triterpenos pentacíclicos representan la mayoría de los compuestos triterpénicos en el fruto de la oliva destacando la presencia de los ácidos maslínico y oleanólico (Stiti *et al.*, 2007; Guinda *et al.*, 2010). Estos compuestos se encuentran principalmente en las ceras superficiales de la epidermis de la fruta (Bianchi *et al.*, 1992; Romero *et al.*, 2017; Diarte *et al.*, 2019). Por ello, entre los subproductos generados durante la extracción del aceite, se ha descubierto que la piel de orujo de oliva es una fuente importante de ácidos triterpénicos, que pueden alcanzar hasta 120 g/kg, de estos el ácido maslínico comprende el 70% de los triterpenos totales (Romero *et al.*, 2018). Por lo anterior, la cantidad de ácidos triterpénicos en diferentes variedades de aceitunas es mucho mayor que el reportado para los aceites de oliva virgen (Romero *et al.*, 2010).

a) Ácido maslínico

El ácido maslínico o ácido (2 α ,3 β)-dihidroxi-olean-12-en-28-oico (Figura 1.6) es un metabolito secundario de las plantas de fórmula química $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ y peso molecular de 472,7. Se ha aislado por primera vez en 1927 de *Crataegus monogyna* L. y se ha detectado en 30 especies de plantas siendo uno de los triterpenos principales de *Olea europaea* L. Estudios *in vitro* e *in vivo* han permitido establecer diferentes efectos biológicos, entre las que destacan la actividad antiinflamatoria, antioxidante, antidiabética, neuroprotectora y antineoplásica, entre otras (Lozano-Mena *et al.* 2014).

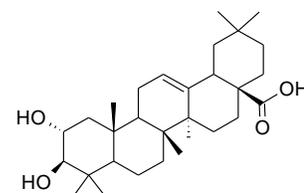


Figura 1.6. Estructura química del ácido maslínico.

b) Ácido oleanólico

El ácido oleanólico o ácido 3 β -hidroxi-olean-12-en-28-oico (Figura 1.7), tiene un peso molecular de 456,7 y su fórmula química es $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Este compuesto se ha aislado de más de 1600 especies que incluyen tanto alimentos como plantas medicinales. El ácido oleanólico posee importantes actividades farmacológicas, siendo las más destacadas su efecto hepatoprotector, antiinflamatorio, antioxidante, antidiabético y antitumoral (Juan *et al.*, 2020).

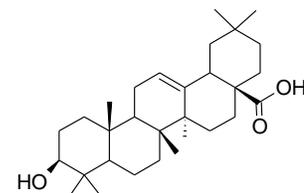


Figura 1.7. Estructura química del ácido oleanólico.

c) Ácido ursólico

El ácido ursólico o ácido 3 β -hidroxi-ursan-12-en-28-oico (Figura 1.8), es un isómero del ácido oleanólico con peso molecular de 456,7 y fórmula química de C₃₀H₄₈O₃. El ácido ursólico, se ha aislado de muchos tipos de plantas medicinales, así como de frutas y especies consumidas de forma habitual como las manzanas, ciruelas, arándanos, romero, tomillo, albahaca y orégano. Este triterpeno posee diferentes efectos biológicos destacando su actividad antiinflamatoria, antidiabética, antitumoral y antimicrobiana, entre otras (Sánchez-Quesada *et al.*, 2013).

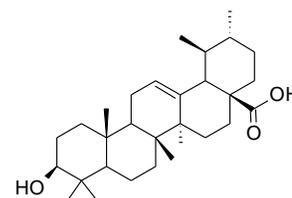


Figura 1.8. Estructura química del ácido ursólico.

d) Eritrodiol

El eritrodiol o 3 β -olean-12-en-3,28-diol (Figura 1.9) es un triterpeno derivado de la β -amirina. El eritrodiol se ha descrito en pocas especies aparte *Olea europaea* L. donde se ha encontrado en el aceite de oliva y en la aceituna. Se ha descrito que exhibe propiedades antiinflamatorias, cardioprotectoras y antitumorales (Juan *et al.*, 2020).

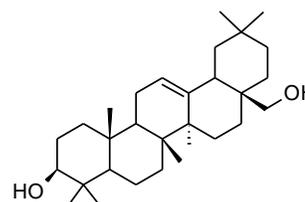


Figura 1.9. Estructura química del eritrodiol.

e) Uvaol

El uvaol o 3 β -ursan-12-en-3,28-diol (Figura 1.10) es un isómero del eritrodiol con peso molecular de 442,7 y fórmula química de C₃₀H₄₈O₃. Este compuesto se ha detectado en alguna planta utilizada en medicina tradicional, así como en las hojas de *Olea europaea* L. Se ha descrito que este triterpeno pentacíclico posee propiedades antiinflamatorias y antitumorales (Sánchez-Quesada *et al.*, 2013).

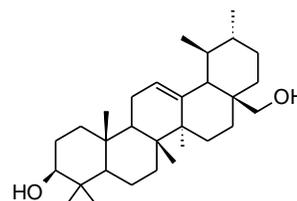


Figura 1.10. Estructura química del uvaol.

1.2.2. Polifenoles

1.2.2.1. Síntesis de polifenoles

Se designan como compuestos fenólicos o polifenoles a un tipo de metabolitos secundarios de las plantas que tienen en común la presencia de al menos un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (Frank *et al.*, 2020). Estos compuestos están involucrados en varias actividades en los vegetales como: maduración, crecimiento, resistencia contra microorganismos, pigmentación y protección contra la radiación ultravioleta, entre otras (Manach *et al.* 2004). La mayoría de los polifenoles contienen restos

Introducción

fenólicos repetidos unidos por enlaces ésteres o por enlaces C-C más estables (Frank *et al.*, 2020). Esto resulta en un grupo muy heterogéneo tanto por su estructura como por sus propiedades que abarca una amplia gama de compuestos químicos (Abdel-Shafy y Mansour 2017; Delgado *et al.*, 2019).

En la síntesis de los polifenoles están implicadas diversas vías que están interconectadas entre ellas, tales como las vías del 2-C-metil-d-eritrodio 4-fosfato, mevalonato, shikimato y fenilpropanoide (Abdel-Shafy y Mansour 2017). Actualmente se conocen más de 8000 estructuras fenólicas distribuidos ampliamente en las plantas (Tsao, 2010). Los fenoles pueden clasificarse de acuerdo con su fuente de origen, función biológica y estructura química. De acuerdo con esta última característica, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en dos grandes grupos, los no flavonoides y los flavonoides (Pereira *et al.*, 2009). En el grupo de los no flavonoides se han descrito las siguientes subclases: alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, secoiridoides, lignanos, estilbenos, xantonas y taninos (Durazzo *et al.*, 2019). Por otra parte, el grupo de los flavonoides está formado por un amplio grupo de compuestos divididos en las siguientes subclases: antocianos, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavononas e isoflavonas (Durazzo *et al.*, 2019).

1.2.2.2. Polifenoles en *Olea europaea* L.

Los polifenoles se encuentran en un gran número de alimentos y bebidas de origen vegetal. En un estudio donde se identificaron los 100 alimentos más abundantes en polifenoles, se concluyó que las dos fuentes vegetales más ricas en polifenoles son las aceitunas negras y verdes (Pérez-Jiménez *et al.*, 2010). En *Olea europaea* L. se han identificado 4 subclases de polifenoles no flavonoides como los alcoholes fenólicos, los ácidos fenólicos, los secoiridoides y los lignanos; así como 2 subclases de flavonoides como las flavonas y los flavonoles (Charoenprasert y Mitchell, 2012).

La cantidad y calidad de los compuestos fenólicos de las olivas son determinadas por la variedad, el estado de maduración, la temporada y la parte del fruto (Bianchi, 2003). En general, los fenoles se encuentran en la epidermis de la fruta y en las estructuras que rodean a la semilla. En la pulpa fresca, los compuestos fenólicos pueden alcanzar entre el 1 y 3%; entre ellos, se destaca la presencia de la oleuropeína y el fenol derivado de su hidrólisis, el hidroxitirosol (Charoenprasert y Mitchell, 2012).

En la elaboración de las aceitunas la concentración de secoiridoides disminuye y, concomitantemente, el hidroxitirosol y el tirosol, productos derivados de la hidrólisis de la oleuropeína y el ligstrósido, aumentan. Además, la fermentación natural que se presenta en las aceitunas naturales resulta en una mayor retención de los compuestos fenólicos en comparación con las aceitunas verdes estilo español o las aceitunas negras estilo californiano (Charoenprasert y Mitchell, 2012). Se ha reportado que el

contenido de polifenoles en aceitunas de la variedad Marfil procesadas por el método natural es de 866,2 mg/kg (Moreno-González *et al.*, 2020); mientras que el contenido de fenoles totales en el aceite de oliva oscila entre 196 a 500 mg/kg, siendo superior en la variedad extra virgen donde pueden encontrarse entre un rango de 250,8 a 925,8 mg/kg (Guo *et al.*, 2018).

a) Apigenina

La apigenina o 4',5,7-trihidroxiflavona (Figura 1.11) tiene un peso molecular de 270,24 y fórmula química de $C_{15}H_{10}O_5$. Esta flavona se encuentra en plantas medicinales y diversos alimentos como frutas y verduras (Ali *et al.*, 2016). Se han descrito numerosas actividades biológicas para este polifenol, tales como antioxidante, antidiabético, antitumoral, neuroprotector y antiviral (Hostetler *et al.*, 2017).

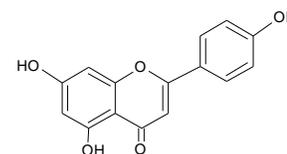


Figura 1.11. Estructura química de la apigenina.

b) Ácido cafeico

El ácido cafeico o ácido 3,4-dihidroxicinámico (Figura 1.12) tiene un peso molecular de 180,16 y fórmula química de $C_9H_8O_4$. Este polifenol está ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en una amplia variedad de frutas, vegetales, bebidas y plantas utilizadas en medicina tradicional asiática (Magnani *et al.*, 2014). Se le han descrito potenciales actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antineoplásicas y neuroprotectoras (Magnani *et al.*, 2014).

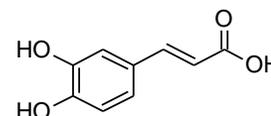


Figura 1.12. Estructura química del ácido cafeico.

c) Ácido *p*-cumárico

El ácido *p*-cumárico o ácido *trans*-4-hidroxicinámico (Figura 1.13), con peso molecular de 164,16 y fórmula química de $C_9H_8O_3$, es un metabolito intermediario de la síntesis de una gran variedad de fenoles y se encuentra presente de forma esterificada o libre en frutas y vegetales. Entre las actividades biológicas que ejerce se encuentran su poder antioxidante, antimicrobiano, antiviral, anticancerígeno, antidiabético, antipirético y analgésico (Navaneethan *et al.*, 2014).

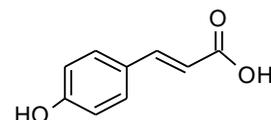


Figura 1.13. Estructura química del ácido *p*-cumárico.

Introducción

d) Ácido vanílico

El ácido vanílico o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (Figura 1.14), con peso molecular de 168,15 y fórmula química de $C_8H_8O_4$, es un derivado del ácido cafeico. Este polifenol se utiliza como aromatizante, siendo uno los ingredientes más importantes del sabor vainilla (Kim *et al.*, 2010). Entre sus propiedades biológicas destacan su capacidad quimiopreventiva, antioxidante, hepatoprotectora, antimicrobiana y antiviral (Kim *et al.*, 2010).

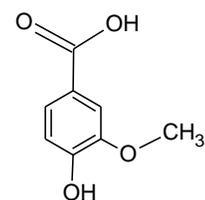


Figura 1.14. Estructura química del ácido vanílico.

e) Catecol

El catecol o 1,2-bencenodiol (Figura 1.15), con peso molecular de 110,11 y fórmula química de $C_6H_6O_2$, es un fenol alcohólico presente en frutas, vegetales y setas (Corzo-Martínez *et al.*, 2012). También se ha detectado en los alimentos derivados de *Olea europaea* L. Entre las propiedades biológicas destacan su capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Corzo-Martínez *et al.*, 2012).

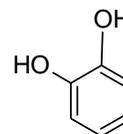


Figura 1.15. Estructura química del catecol.

f) Hidroxitirosol

El hidroxitirosol o 2-(3,4-dihidroxifenil)etanol (Figura 1.16) posee un peso molecular de 154,16 y fórmula química de $C_8H_{10}O_3$. Este metabolito vegetal ha sido aislado de *Olea europaea* L. y ha presentado actividad antioxidante, antiinflamatoria y antineoplásica. Lo anterior, a través de la regulación de la expresión de varios componentes de la respuesta inflamatoria, la proliferación de células tumorales, la eliminación de los radicales libres, entre otros (Karković Marković *et al.*, 2019).

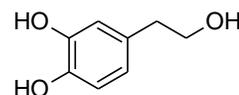


Figura 1.16. Estructura química del hidroxitirosol.

g) Hidroxitirosol acetato

El hidroxitirosol acetato o 2-(3,4-dihidroxifenil)etil acetato (Figura 1.17), con peso molecular de 196,20 y fórmula química de $C_{10}H_{12}O_4$, es un derivado de hidroxitirosol presente en el fruto y las hojas de *Olea europaea* L. Los efectos beneficiosos más conocidos incluyen la capacidad antioxidante, neuroprotectora y antiinflamatoria (Rosillo *et al.*, 2015).

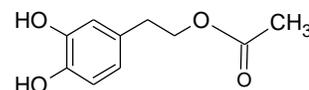


Figura 1.17. Estructura química del hidroxitirosol acetato.

h) Luteolina

La luteolina o 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona (Figura 1.18), es una tetrahidroxiflavona con peso molecular de 286,24 y fórmula química de $C_{15}H_{10}O_6$. Se ha descrito que este flavonoide tiene potenciales actividades antioxidantes, antiinflamatorias y quimiopreventivas. Tras su administración, la luteolina elimina los radicales libres, protege las células del daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) e induce la detención directa del ciclo celular y la apoptosis en las células tumorales (López-Lázaro, 2009).

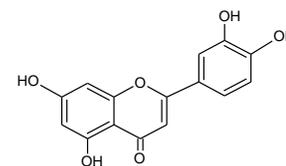


Figura 1.18. Estructura química de la luteolina.

i) Luteolina 7-O-glucosido

La luteolina 7-O-glucósido o 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona 7-glucósido (Figura 1.19), con peso molecular de 448,4 y fórmula química de $C_{21}H_{20}O_{11}$, deriva de la luteolina. Esta flavona se encuentra en diversos alimentos como las aceitunas, alcachofas, cacao y alcaparras, así como especies tales como tomillo, salvia, comino y perejil. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que posee actividad antioxidante, neuroprotectora, antiinflamatoria y antitumoral (Chen et al., 2018).

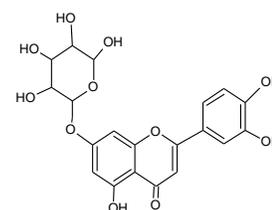


Figura 1.19. Estructura química de la luteolina 7-O-glucosido.

j) Oleuropeína

La oleuropeína (Figura 1.20), de peso molecular de 540,5 y fórmula química de $C_{25}H_{32}O_{13}$, es un glucósido secoiridoide. Su estructura química se caracteriza por poseer un éster de ácido elenólico e hidroxitirosol y un residuo glucosídico. Es el compuesto fenólico más importante presente en la oliva y es el precursor del hidroxitirosol. Se ha descrito que este metabolito vegetal juega un papel importante como antioxidante, antiinflamatorio, antineoplásico, antihipertensivo y neuroprotector, entre otros (Nediani *et al.*, 2019).

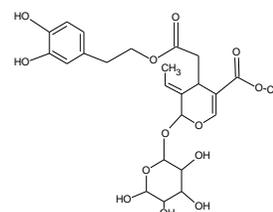


Figura 1.20. Estructura química de la oleuropeína.

Introducción

k) (+)-Pinoresinol

El (+)-pinoresinol (Figura 1.21) posee un peso molecular de 358,4 y fórmula química de $C_{20}H_{22}O_6$. Este compuesto se ha identificado en cereales, frutas, frutos secos y vegetales. Se le han descrito actividades biológicas tales como antioxidante, antiinflamatorio, antifúngico, hipoglucemiante, neuroprotector y anticancerígeno (Yu et al., 2019).

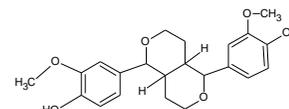


Figura 1.21. Estructura química del (+)-pinoresinol.

l) Quercetina

La quercetina o 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona (Figura 1.22) tiene un peso molecular de 302,23 y fórmula química de $C_{15}H_{10}O_7$. Es uno de los flavonoides más abundantes en vegetales, frutas, vino y té. De este compuesto destacan su actividad antiviral, antibacteriana, cardioprotectora, antioxidante, neuroprotectora y anticancerígena (Anand David et al., 2016).

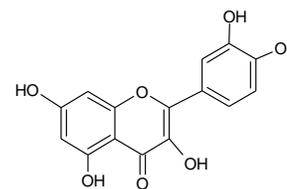


Figura 1.22. Estructura química de la quercetina.

m) Rutina

La rutina o quercetina 3-rutinósido (Figura 1.23), de peso molecular de 610,5 y fórmula química de $C_{27}H_{30}O_{16}$, es un glucósido de flavonol que se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal. Entre sus propiedades biológicas destacan su capacidad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena, antidiabética, antialérgica, neuroprotectora y cardioprotectora (Gullón et al., 2017).

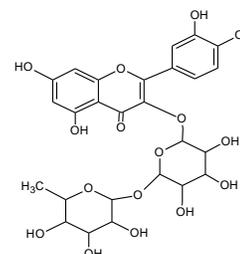


Figura 1.23. Estructura química de la rutina.

n) Salidroside

La salidroside o 2-(4-hidroxifenil)etil β -D-glucopiranosido (Figura 1.24), de peso molecular de 300,3 y fórmula química de $C_{14}H_{20}O_7$, se ha encontrado en las semillas del fruto de *Olea europaea* L, aunque también se ha encontrado en otras plantas utilizadas en medicina tradicional. Se han descrito diversos efectos beneficiosos tales como anticancerígeno, antifatiga, antioxidante, antiinflamatorio, antiviral, cardioprotector, neuroprotector y hepatoprotector (Xie et al., 2020).

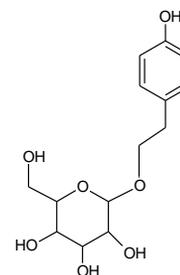


Figura 1.24. Estructura química de la salidroside.

ñ) *Tirosol*

El tirosol o 2-(4-hidroxifenil)etanol (Figura 1.25) tiene un peso molecular de 138,16 y fórmula química de $C_8H_{10}O_2$. La fuente dietética principal de este polifenol son las aceitunas de mesa y el aceite de oliva, aunque también se ha encontrado en los vinos blancos y tintos. Diversos estudios indican que posee actividad antioxidante, aunque menor que el hidroxitirosol, así como efectos antiinflamatorios, cardioprotectores, neuroprotectores, antidiabético y antiaparasitaria, entre otros (Karković-Marković *et al.*, 2019).

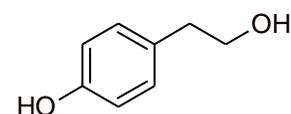


Figura 1.25. Estructura química del tirosol.

o) *Verbascósido*

El verbascósido o acteósido (Figura 1.26) de peso molecular de 624,6 y fórmula química de $C_{29}H_{36}O_{15}$, es un éster heterosídico del ácido cafeico y del hidroxitirosol. Este compuesto se haya ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en las especies del género *Verbascum*, aunque las fuentes alimentarias se restringen al aceite de oliva, la aceituna y la hierbaluisa. Se ha descrito al verbascosido como un compuesto con actividad antiinflamatoria, antibacteriana, neuroprotectora y anticancerígena (Alipieva *et al.*, 2014).

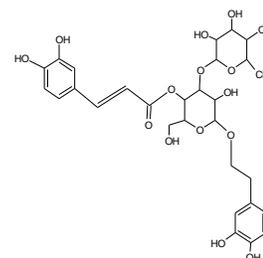


Figura 1.26. Estructura química del verbascósido.

II. OBJETIVOS

2. Objetivos

En los últimos años la comunidad científica del área de nutrición y ciencias de la alimentación ha centrado gran parte de su atención en estudiar los componentes bioactivos presentes en los alimentos, es decir, aquellos compuestos que mejoran el estado de salud y/o reducen el riesgo de padecer enfermedades. Entre ellos se encuentran los triterpenos pentacíclicos y polifenoles, los cuales son metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, incluidas las especies utilizadas en la medicina tradicional y en alimentos comprendidos en el patrón dietético de la dieta mediterránea (Juan *et al.*, 2020). Dentro de la pirámide de la dieta mediterránea se encuentran los alimentos derivados de la *Olea europaea* L., tales como el aceite de oliva y las aceitunas de mesa. Estas últimas fueron incorporadas en este esquema dietético en el año 2010, recomendando su consumo de una a dos raciones por día (Serra-Majem *et al.*, 2020). No obstante, y a pesar de su origen común, el estudio del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa no ha sido comparable. Existe un gran número de investigaciones sobre el consumo del aceite de oliva y sus efectos en la salud, mientras que los ensayos con aceitunas de mesa son escasos (Rocha *et al.*, 2020).

Las aceitunas de mesa ofrecen una amplia gama de nutrimentos que no se transfieren al aceite de oliva durante el proceso de su extracción (Brenes y Kailis, 2021). Además, contienen una gran cantidad de grasas de alta calidad, aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas, fibra, triterpenos pentacíclicos y polifenoles (Boskou, 2017). Recientemente, Moreno-González *et al.* (2020a, 2020b) estudiaron la concentración de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina, Empeltre y Marfil; encontrando que, en estas variedades, tanto los triterpenos –ácido maslínico y ácido oleanólico– como los polifenoles –hidroxitirosol y luteolina– son muy abundantes. El ácido maslínico y el ácido oleanólico se han encontrado en el plasma de ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Marfil (Giménez *et al.*, 2017), mientras que concentraciones plasmáticas de hidroxitirosol y luteolina se han detectado en ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Arbequina (Kundisová *et al.*, 2020). Por otra parte, se ha demostrado que el aceite de oliva concentrado en triterpenos ejerce efectos antihipertensivos en ratas hipertensas (Valero-Muñoz *et al.*, 2014) y el aceite de oliva enriquecido con polifenoles disminuye la presión arterial sistólica en sujetos sanos (Sarapis *et al.*, 2020). Dado que las aceitunas representan una fuente dietética importante de compuestos bioactivos; el objetivo general de la presente tesis doctoral consiste en estudiar la composición de las aceitunas Arbequina, variedad altamente producida en Catalunya que destaca por su importancia cultural, sus características organolépticas y su extensa comercialización. El objeto de estudio será la administración de aceitunas Arbequina a ratas, así como a voluntarios sanos en una intervención nutricional para determinar, en ambos casos, las concentraciones plasmáticas y la farmacocinética de

Objetivos

los compuestos triterpénicos después de su consumo. Además, se evaluará el efecto de la ingestión de las aceitunas en la presión arterial en ratas y voluntarios sanos.

El objetivo general de la tesis doctoral se desglosa en cinco apartados que se describen a continuación:

1. Estudio de los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles en las aceitunas de mesa de la variedad Arbequina y en el pienso comercial para rata.

Determinar los triterpenos pentacíclicos y los compuestos fenólicos en las aceitunas de la variedad Arbequina, con el objetivo de conocer la cantidad de compuestos bioactivos ingeridos en los ensayos realizados. Además, se analizará el pienso comercial con el cual todas las ratas serán alimentadas para descartar que los compuestos encontrados en el plasma de los animales no provengan del pienso. Previa validación del método, la determinación de los triterpenos y los polifenoles se realizará por LC-APCI-MS y LC-ESI-MS/MS, respectivamente.

2. Concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Arbequina.

Analizar la concentración de los triterpenos y sus derivados en plasma de ratas Sprague-Dawley (SD) mediante LC-APCI-MS, después de la administración oral de un homogenado de aceitunas deshuesadas a las dosis de 3,85 y 7,70 g de aceitunas/kg de peso; estas dosis son equivalentes al consumo humano de 30 y 60 aceitunas Arbequina. A partir de estos resultados, se realizará el estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos encontrados en sangre y sus metabolitos siguiendo un enfoque no compartimental.

3. Efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina en la presión arterial y el peso corporal en ratas normotensas e hipertensas.

Evaluar el efecto de la ingesta de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso en la presión arterial durante 24 horas; así como el consumo diario de esta dosis de Arbequinas durante 49 días en ratas Wistar Kyoto (WKY) y Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). La presión arterial se evaluará en ratas conscientes mediante un sistema de medición no invasivo. Además, al finalizar el estudio, se determinarán las concentraciones plasmáticas de los triterpenos y los polifenoles por LC-APCI-MS y LC-ESI-MS/MS, respectivamente.

4. Intervención nutricional: concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en voluntarios sanos después del consumo de aceitunas de la variedad Arbequina.

Realizar una intervención nutricional cruzada, aleatorizada y abierta con aceitunas de la variedad Arbequina, formada por dos fases. En la primera, se estudiarán las concentraciones plasmáticas durante 24 horas de los triterpenos y sus derivados después de la ingesta única de 60 y 120 Arbequinas. A partir de las concentraciones de los triterpenos en plasma se realizará el estudio farmacocinético siguiendo una aproximación no compartimental. En la segunda fase se estudiarán las concentraciones de los triterpenos en plasma después del consumo diario de 60 Arbequinas durante 30 días. En ambas fases, las concentraciones plasmáticas de los compuestos se determinarán por LC-APCI-MS.

5. Intervención nutricional: efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina sobre la presión arterial y el peso corporal en voluntarios sanos.

Estudiar la presión arterial en hombres sanos durante 24 horas después del consumo de 60 y 120 aceitunas de la variedad Arbequina y la presión arterial en hombres y mujeres sanos 15 y 30 días después del consumo diario de 60 aceitunas. La presión arterial se medirá mediante un dispositivo digital automatizado en posición decúbito.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1. Analitos, disolventes y soluciones stock

El ácido betulínico (patrón interno [IS] de los triterpenos pentacíclicos), la apigenina, luteolina, luteolina-7-*O*-glucósido, ácido oleanólico, tirosol, ácido ursólico, uvaol y el verbascósido se adquirieron en Extrasynthèse (Genay, Francia). El 2-(3-hidroxifenil)-etanol (IS de los polifenoles), el ácido cafeico, catecol, eritrodiol, ácido L-ascórbico, ácido maslínico, oleuropeína, ácido *p*-cumárico, (+)-pinoresinol, quercetina, rutina, salidroside y ácido vanílico fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Tres Cantos, España). El hidroxitirosol y el acetato de hidroxitirosol se adquirieron en Seprox BIOTECH (Madrid, España). La acetona, acetonitrilo, 2-propanol, metanol y tetrahidrofurano fueron proveídos por Panreac Química S.L.U. (Castellar del Vallès, España). El etanol y el acetato de etilo fueron suministrados por J.T. Baker (Deventer, Países Bajos) y el ácido acético por Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los productos químicos utilizados en la preparación de las soluciones fueron de grado analítico y todos los solventes fueron de grado LC-MS. El agua se obtuvo mediante el sistema de purificación Milli-Q de Millipore (Madrid, España).

Las soluciones stock de los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles, así como de los patrones internos, se prepararon en metanol al 80% a la concentración de 250 μ M. Para lograr lo anterior, cada compuesto se disolvió en 80 ml de metanol al 100% mediante agitación magnética durante 30 minutos y mediante la inmersión en un baño de ultrasonidos (Fungilab, Sant Feliu del Llobregat, España) durante otros 30 minutos. Posteriormente, las soluciones se transfirieron a matraces aforados en donde se ajustó al volumen final de 100 ml con agua Milli-Q. Finalmente, las soluciones se agitaron durante 15 minutos antes de preparar alícuotas de 2 ml que se conservaron a -20°C. En cada experimento, las soluciones stock se utilizaron para elaborar soluciones de trabajo que contenían una mezcla de los 5 triterpenos pentacíclicos o una mezcla de los 16 polifenoles disueltos en metanol al 80%.

3.2. Equipos cromatográficos

En el estudio de los triterpenos pentacíclicos y polifenoles se utilizaron dos equipos cromatográficos diferentes.

Un cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC (Waters, Michigan, EUA) acoplado a un sistema API 3000 triple cuadrupolo (AB Sciex, Toronto, Canadá) con fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) para los triterpenos pentacíclicos y con fuente de ionización por electrospray (ESI) para los

Material y métodos

polifenoles. Este equipo se utilizó para el estudio de los compuestos bioactivos en las aceitunas de la cosecha 2016-2017 y en el pienso de rata.

Un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) acoplado a un sistema QTRAP 4000 (AB Sciex, Toronto, Canadá) consistente en un sistema híbrido triple cuadrupolo/trampa de iones con fuente de ionización APCI y ESI para los triterpenos y los polifenoles, respectivamente. Este equipo fue empleado para determinar los triterpenos pentacíclicos en las aceitunas Arbequina (cosecha 2015-2016), así como las concentraciones plasmáticas en las ratas Sprague-Dawley (SD). También se utilizó para la cuantificación de los triterpenos y polifenoles en plasma de las ratas Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) y las ratas Wistar Kyoto (WKY). Por último, este equipo fue utilizado en la determinación de los triterpenos en plasma en la intervención nutricional.

Los equipos fueron controlados por el software Analyst en las versiones 1.4.2 (API3000) y 1.6.2 (QTRAP) (AB Sciex, Toronto, Canadá). El software también se utilizó en la adquisición y procesamiento de datos. Ambos equipos se localizan en el *Centre Científic i Tecnològic de la Universitat de Barcelona* (CCiTUB).

3.3. Animales de experimentación

En el estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos contenidos en las aceitunas Arbequina, se emplearon ratas macho SD de 250-350 g procedentes de la Unidad de Estabulación Animal de la *Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona*.

El estudio del efecto del consumo de aceitunas sobre la presión arterial se llevó a cabo en ratas macho de las cepas SHR y su control normotenso, las ratas WKY suministradas por el laboratorio Envigo (Huntingdon, Reino Unido). Para este estudio se eligieron animales de 9 semanas de edad ya que, de acuerdo con Dornas y Silva (2011), a esta edad la hipertensión de las SHR ya está establecida. Estos animales fueron manipulados en la Unidad de Estabulación Animal de la *Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació*.

Todos los animales se dividieron aleatoriamente en jaulas (dos ratas por jaula) en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, y se mantuvieron en cuarentena una semana antes del inicio de su respectivo experimento. En cada estudio, la manipulación de los animales se realizó a la misma hora del día para minimizar el efecto de los ritmos circadianos. Todas las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar (2014 Teklad Global 14%, Envigo Rms España SLU, Sant Feliu de Codines, España) y agua del grifo *ad libitum*. Esta dieta

comercial tiene la siguiente composición en 100 g de producto: 290 kcal, 15 g de proteínas crudas, 4 g de lípidos, 48 g de carbohidratos, 4 g de fibra cruda, 4,7 g de cenizas y 100 mg de sodio. En relación con la composición lipídica, esta incluye 0,60 g de ácidos grasos saturados, 0,70 g de monoinsaturados y 2,10 g de poliinsaturados.

Los protocolos de experimentación en animales seguidos en este estudio estaban en total conformidad con las directrices de la Comunidad Europea para el cuidado y manejo de animales de laboratorio. Los estudios fueron aprobados por el *Comitè Ètic d'Experimentació Animal* (CEEA) de la *Universitat de Barcelona*. El procedimiento que lleva por título “Estudio de la biodisponibilidad de los polifenoles y triterpenos pentacíclicos de la *Olea europea* L. en ratas Sprague Dawley” recibió el número 104/17 mientras que el procedimiento titulado “Evaluación del efecto de la administración oral de aceitunas de mesa sobre la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en ratas control normotenso (WKY)” se identificó con el número 105/17. Además, el Comité Ético de Experimentación Animal de la Generalitat de Catalunya aprobó ambos procedimientos dentro del proyecto con número de referencia 9468.

3.4. Sujetos de investigación

3.4.1. Tamaño de muestra

Se realizó una intervención nutricional que evaluaba la concentración plasmática de los triterpenos pentacíclicos procedentes de las aceitunas en sujetos sanos. Este estudio se organizó en dos etapas; la primera corresponde al estudio de la farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos en 18 hombres sanos que consumieron una dosis de 60 y 120 aceitunas de la variedad Arbequina. En la segunda etapa, se cuantificó la concentración plasmática de los triterpenos después de 30 días del consumo diario de 60 Arbequinas por hombres y mujeres sanos. El cálculo de la muestra se realizó teniendo como punto final los niveles de colesterol, suponiendo una variabilidad de 23 mg/dl, una potencia del 80% y un nivel alfa de 0,05. Con la intención de detectar una variación de 10 mg/dl, se necesitaba incluir un total de 39 sujetos, no obstante, se incluyeron 40 participantes masculinos y femeninos.

3.4.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Los sujetos de investigación de ambos estudios fueron seleccionados del panel de voluntarios del *Centre d'Investigació del Medicament* (CIM) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Los criterios de inclusión, exclusión y eliminación se presentan en la Figura 3.1. Se estableció que en caso de que un sujeto se retirase voluntariamente del estudio o fuera eliminado por parte del investigador, el sujeto sería reemplazado por otro que sería asignado al mismo grupo de intervención.

Material y métodos

No se permitió el uso de ningún medicamento durante el curso del estudio con excepción de paracetamol según el criterio del investigador.

Después de una explicación completa sobre los métodos, beneficios y riesgos de la participación en el estudio, los voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión y que aceptaron participar en la investigación firmaron el consentimiento informado. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética y de Investigación Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (IIBSP-OLI-2016-23). El estudio se realizó en el mismo hospital de acuerdo con las recomendaciones internacionales para la investigación clínica recogidos en la declaración de Helsinki (2013) y siguiendo la Guía Tripartita Armonizada (ICH Expert Working Group, 1996), los principios de las Buenas Prácticas Clínicas (CPMP/ICH/135/95) y las directrices del Ministerio de Salud Español (Real Decreto 1090/2015). Por último, el ensayo fue registrado en ClinicalTrials.gov (NCT03886597).

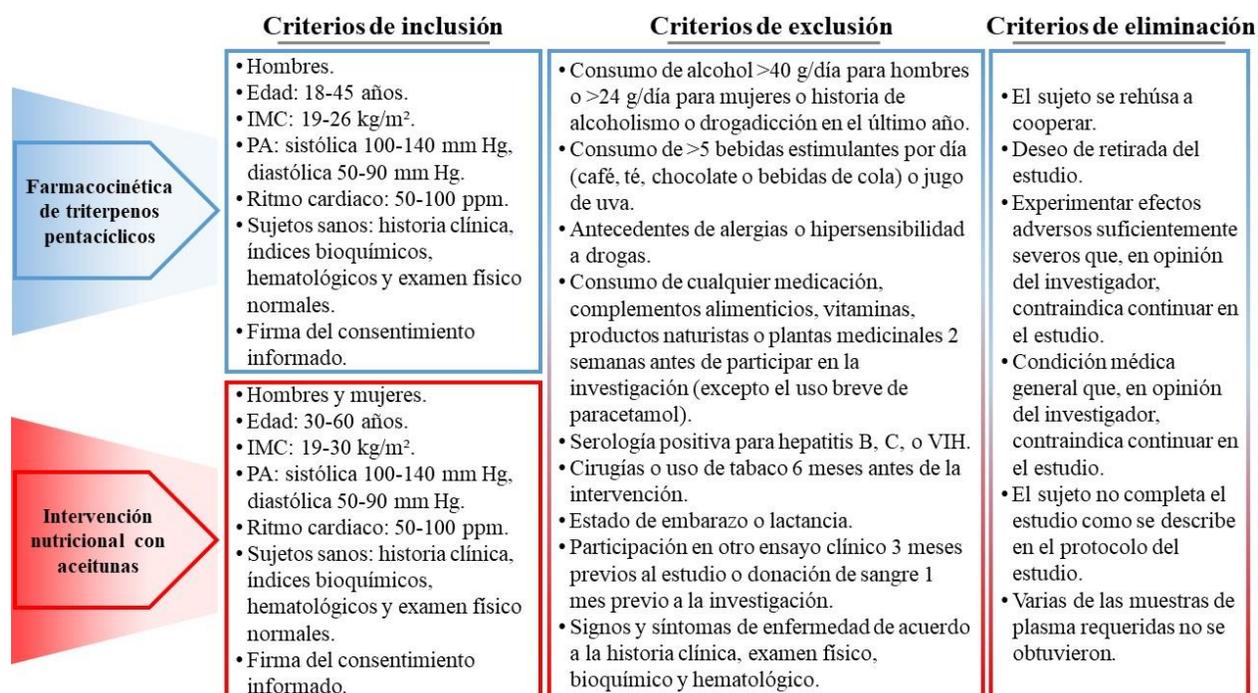


Figura 3.1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación utilizados en la intervención nutricional.

3.5. Aceitunas de la variedad Arbequina

3.5.1. Composición nutricional

La Cooperativa del Camp en Maials (Lleida, España) proporcionó las aceitunas de la variedad Arbequina. Estas fueron elaboradas de acuerdo el método griego, el cual consiste en someter a las olivas a una fermentación natural seguido de su conservación en salmuera. Las aceitunas fueron almacenadas a 5°C protegidas de la luz. La cosecha del 2015-2016 se administró a las ratas SD, mientras tanto, la cosecha del 2016-2017 se utilizó en el experimento con ratas WKY y SHR y en las intervenciones nutricionales. Según los productores, las aceitunas Arbequina tenían la composición nutricional indicada en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Información nutricional de la porción comestible de las aceitunas Arbequina.

	Por 100 g
Energía (kcal)	211
Lípidos totales (g)	21,0
Ácidos grasos saturados (g)	3,90
Hidratos de carbono (g)	0,00
Azúcares (g)	0,00
Fibra alimentaria (g)	7,20
Proteínas (g)	1,60
Sal (g)	4,30

3.5.2. Selección de las dosis para los estudios en ratas

Con el propósito de estimar las concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos en ratas que consumieron aceitunas, se eligieron las dosis de 3,85 y 7,70 g de Arbequinas/kg de peso corporal. Estas cantidades son equivalentes al consumo humano de 30 y 60 Arbequinas. El efecto del consumo de aceitunas en la presión arterial y la ganancia de peso corporal en las ratas se evaluó con una dosis de 3,85 g de olivas/kg de peso corporal, que es equivalente al consumo humano de aproximadamente 30 Arbequinas.

La traslación de la dosis humana a la dosis que se administró a las ratas se realizó utilizando el método descrito por Reagan-Shaw *et al.* (2008). Por lo tanto, se aplicó la siguiente fórmula:

$$Dosis\ equivalente\ humana\ (mg/kg) = Dosis\ animal\ (mg/kg) \times \frac{Animal\ Km}{Humano\ Km}$$

Material y métodos

La constante K_m permite la normalización de la dosis (mg/kg) en función del área de superficie corporal (m^2) de cada especie. El factor K_m para una persona de 60 kg es de 37; mientras que el factor K_m para una rata de 150 g es de 6. De este modo, las dosis humanas de 30 y 60 Arbequinas (0,62 y 1,24 g/kg corporal) corresponden a la dosis de 3,85 y 7,70 g/kg corporal en las ratas.

3.5.3. Preparación de la suspensión de aceitunas administrada a ratas

En la preparación de la suspensión homogénea de aceitunas, cada aceituna se secó con papel filtro y posteriormente el hueso se separó con la ayuda de un bisturí. En un tubo falcón de 50 ml se colocaron 15,4 o 30,8 g de aceitunas deshuesadas para las dosis de 3,85 y 7,70 g/kg de peso corporal, respectivamente. A continuación, se agregaron 9 ml de agua Milli-Q y se realizó el triturado en un homogeneizador Polytron® acoplado al brazo 20 TS (Kinematica AG, Lucerna, Suiza) con 6 ciclos de 30 segundos y una velocidad de 5. En todo momento, el tubo falcón se mantuvo sumergido en hielo y entre cada ciclo se realizó una pausa de 1 minuto. Posteriormente, el brazo se lavó con 9 ml de agua Milli-Q (30 segundos, velocidad 5) usando un nuevo tubo falcón. El líquido del lavado se añadió a la suspensión homogénea y se mezcló en un vórtex durante 1 minuto. El proceso de limpieza del brazo se repitió 3 veces más con 6 ml de agua Milli-Q en cada lavado, hasta llegar a obtener una suspensión fina y homogénea con 36 ml de agua Milli-Q (Figura 3.2). Finalmente, se tomó una alícuota de cada suspensión de aceitunas y se almacenó a -20°C protegida de la luz hasta el análisis de los componentes bioactivos por LC-MS. El brazo del Polytron® se limpió cuidadosamente con agua Milli-Q, metanol al 100% y NaOH al 5% después de la preparación de cada suspensión.

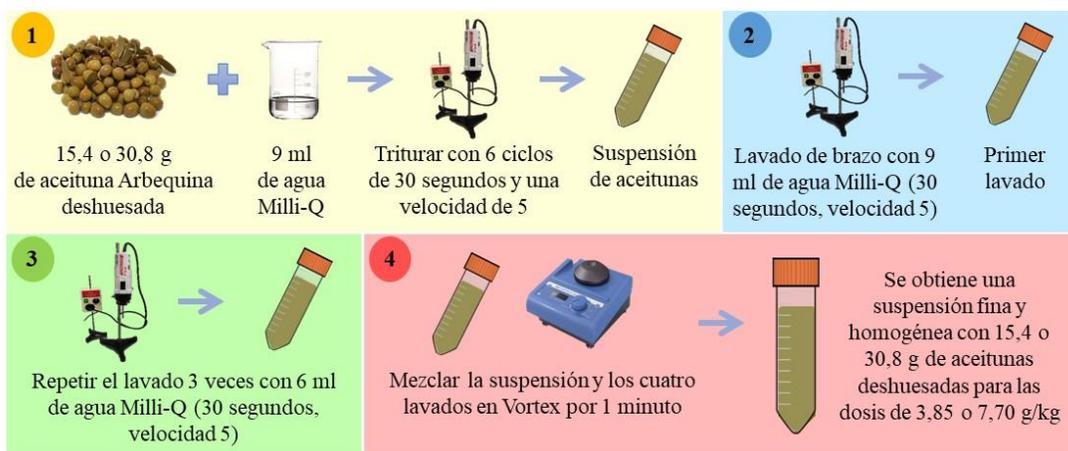


Figura 3.2. Procedimiento para la preparación de la suspensión de aceitunas Arbequina.

3.5.4. Selección de las dosis para las intervenciones nutricionales

En la primera fase de la intervención nutricional, las cantidades de 60 y 120 aceitunas fueron utilizadas para evaluar la farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos proporcionados por las Arbequinas en sujetos sanos. En la segunda fase, la dosis de 60 aceitunas fue consumida en dos tomas de 30 aceitunas con la comida y de otras 30 con la cena durante 30 días.

3.6. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina

3.6.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina

Los triterpenos pentacíclicos de 4 suspensiones de aceitunas (cosecha 2015-2016) y los triterpenos pentacíclicos y polifenoles de 5 suspensiones de aceitunas (cosecha 2016-2017) se extrajeron siguiendo el método establecido por Moreno-González *et al.* (2020). Para ello, las suspensiones se descongelaron a temperatura ambiente y se colocó 1 g de cada alícuota en un tubo falcón de 15 ml. Posteriormente, se agregaron 6 ml de etanol-metanol (1:1, v/v) desglosados de la siguiente forma: 3 ml de etanol (100%), 1,68 ml de metanol (100%), 1,30 ml de ácido betulínico (1000 μM , IS de los triterpenos) y 0,02 ml de 2-(3-hidroxifenil)-etanol (2620,15 μM , IS de los polifenoles) ambos patrones internos disueltos en metanol 80%. Las mezclas de la muestra y el disolvente se agitaron fuertemente en un vórtex durante 5 minutos y a continuación se centrifugaron a 3345xg durante 30 minutos a 4°C (Centrifuge Megafuge 1.0, Heraeus, Instrument GmbH, Hanau, Alemania). Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos falcón de 15 ml y los sedimentos remanentes se sometieron a una segunda y tercera extracción con 3 ml de etanol-metanol (1:1, v/v). Los sobrenadantes de las 3 extracciones se reunieron en un nuevo tubo falcón y se mezclaron en vórtex para obtener una muestra homogénea. Posteriormente, y con el objetivo de eliminar las partículas sólidas residuales, se llevaron a cabo 2 procesos de centrifugación: el primero se realizó a 3345xg durante 30 minutos a 4°C (Centrifuge Megafuge 1.0); mientras que en la segunda centrifugación se colocaron alícuotas de 2 ml en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 25000xg durante 30 minutos a 2°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Al final de la extracción, el IS de los triterpenos pentacíclicos (el ácido betulínico) y el IS de los polifenoles (el 2-(3-hidroxifenil)-etanol), terminaron a una concentración de 100 μM y 4 μM , respectivamente. Los sobrenadantes se filtraron (filtros de jeringa PTFE de 0,45 μM) y se prepararon 3 tipos muestras a partir de ellos. La primera fue sometida a una dilución 1/50 en metanol al 80% para determinar ácido maslínico, ácido oleanólico, hidroxitirosol y verbascósido. Los ácidos maslínico y oleanólico se calcularon con el método de adición del patrón interno (el ácido betulínico) y este se encontraba en esta dilución a la concentración final de 2 μM . En cambio, el hidroxitirosol se analizó

Material y métodos

con una recta de calibración sin IS. La segunda muestra se diluyó a 1/4 para analizar los polifenoles restantes, los cuales se determinaron con una recta patrón normalizada por el IS (2-(3-hidroxifenil)-etanol) que se encontraba en esta dilución a la concentración de 1 μM . Finalmente, la tercera muestra se preparó utilizando los sobrenadantes filtrados y no diluidos para evaluar la presencia de eritrodíol, ácido ursólico y uvaol. Las muestras se colocaron en un vial sin inserto de color ámbar para su análisis inmediato por LC-MS (Figura 3.3).

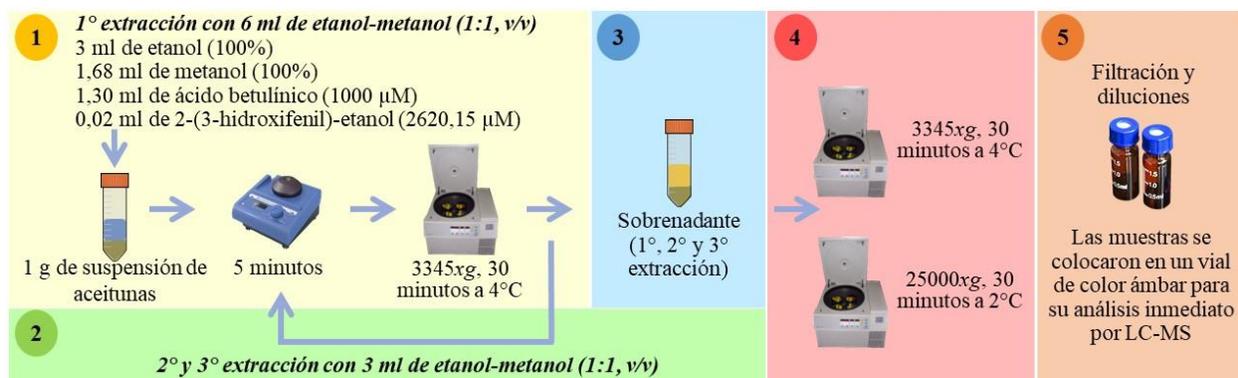


Figura 3.3. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina.

3.6.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 por LC-MS

En el análisis de los triterpenos pentacíclicos de las aceitunas de la variedad Arbequina de la cosecha 2015-2016 administradas a las ratas SD para el estudio farmacocinético, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies) acoplado a un sistema QTRAP 4000 (AB Sciex).

3.6.2.1. Análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016

a) Condiciones cromatográficas

El análisis de triterpenos pentacíclicos por LC-MS se basó en las condiciones previamente descritas por Moreno-González *et al.* (2020). La separación cromatográfica de los triterpenos pentacíclicos se llevó a cabo a través de una fase estacionaria que consta de una columna C18 Zorbax Eclipse PAH con dimensiones de 150 x 4,60 mm (largo x ancho) y tamaño de partícula de 3,5 μm (Agilent Technologies, California, EUA) mantenida a una temperatura de 40°C y un protector columna del mismo material y casa comercial (dimensiones 12,5 x 4,60 mm y tamaño de partícula de 5 μm).

Las muestras se mantuvieron a 10°C antes de la inyección, que se llevó a cabo utilizando un volumen de 10 µl. La fase móvil consistió en agua Milli-Q con ácido acético al 0,05% (fase A) y metanol con ácido acético al 0,05% (fase B) a una velocidad de flujo de 0,80 ml/min. La separación cromatográfica se realizó utilizando el gradiente de elución mostrado en la Tabla 3.2.

La separación de los compuestos se realizó a los 40 minutos del gradiente y, a partir de este momento, se estableció un lavado de la columna durante 4,5 minutos con 100% de la fase B.

Seguidamente se reestablecieron las condiciones iniciales, las cuales se mantuvieron durante 6 minutos antes de la inyección siguiente para asegurar el equilibrio del equipo. El lavado del inyector se realizó con una solución formada por agua Milli-Q y acetonitrilo 10:90 (v/v).

b) Condiciones de espectrometría de masas

La ionización de los triterpenos se llevó a cabo utilizando una fuente APCI mantenida a 500°C en modo negativo (de 0 a 35 minutos) para los triterpenos pentacíclicos ácidos: maslínico, oleanólico, ursólico y betulínico. Para los triterpenos pentacíclicos alcoholes: el eritrodiol y el uvaol, la fuente de ionización se mantuvo a 450°C en modo positivo (de 36 a 50 minutos). La fuente APCI utilizó las siguientes condiciones: N₂ como gas nebulizador a -5 y +5 unidades arbitrarias (ua) para modo de iones negativo y positivo, N₂ como cortina de gas a 25 ua y N₂ como gas 1 y gas 2 a 50 y 0 ua, respectivamente.

Tabla 3.3. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada triterpeno pentacíclico y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-APCI-MS para el análisis en aceitunas de la cosecha 2015-2016 en el instrumento QTRAP 4000.

Triterpeno pentacíclico	Tiempo de retención (min)	m/z	DP (V)	FP (V)	EP (V)
Ácido maslínico	22,5	471,3	-175,0	-170	-10,0
Ácido oleanólico	31,2	455,5	-150,0	-170	-10,0
Ácido ursólico	32,6	455,5	-150,0	-170	-10,0
Ácido betulínico, IS	29,7	455,5	-150,0	-170	-10,0
Eritrodiol	37,3	425,5	+70,0	+160	+10,0
Uvaol	39,2	425,5	+70,0	+160	+10,0

Cociente masa/carga (m/z), potencial de desagrupamiento (DP), potencial de enfoque (FP), potencial de entrada (EP).

Material y métodos

El ajuste óptimo de las condiciones se estableció mediante la infusión directa de cada triterpeno a una concentración de 50 μM (Tabla 3.3). El análisis se realizó utilizando el modo de monitoreo de iones seleccionado (SIM), determinando el ácido maslínico como iones $[\text{M}-\text{H}]^-$ a un cociente masa/carga (m/z) de 471,3 y el ácido oleanólico, ursólico y betulínico (IS) como iones $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z de 455,3. El tiempo de permanencia de 50 ms se empleó para todos ellos. Por otra parte, el eritrodiol y el uvaol fueron monitoreados como iones $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ a m/z de 425,3 con un tiempo de permanencia de 2000 ms.

3.6.2.2. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016

Las soluciones de trabajo para cuantificar los triterpenos pentacíclicos en aceitunas se prepararon a una concentración de 1 y 10 μM . Estas contenían los 5 triterpenos pentacíclicos en metanol al 80% como disolvente de dilución. A partir de las soluciones de trabajo se prepararon 3 réplicas de cada punto de la curva de calibración a las concentraciones finales de 0, 0,5, 1, 1,5 y 2 μM , utilizando el método de adición del estándar que consiste en agregar estas concentraciones de los compuestos directamente a las alícuotas de las suspensiones de aceitunas filtradas. Este método se utiliza en situaciones en las que podría aparecer un efecto de matriz. Los filtrados de aceitunas adicionados con los estándares se diluyeron a la misma concentración que las muestras: 1/50 para la cuantificación de ácido maslínico y ácido oleanólico y no diluidos para determinar eritrodiol, así como para evaluar la presencia de ácido ursólico y uvaol.

Después de analizar las muestras y la curva de calibración por LC-MS, los triterpenos pentacíclicos se identificaron comparando los tiempos de retención de cada compuesto con los presentados por sus estándares en sus correspondientes m/z . Finalmente, la concentración de los ácidos maslínico y oleanólico se obtuvieron interpolando el área ratio, que es la resultante de la relación del área del pico cromatográfico del analito con la del IS, frente a las curvas de calibración. Por otra parte, el eritrodiol se calculó comparando únicamente su área del pico cromatográfico frente a la presentada en la curva de concentración. Los resultados se expresaron en mg del compuesto/kg de aceitunas deshuesadas.

3.6.2.3. Validación del método utilizado para el análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016

El método para determinar triterpenos pentacíclicos en aceitunas se ha puesto a punto y se ha validado por Giménez *et al.* (2015) y posteriormente fue modificado y validado por Moreno-González *et al.* (2020). Sin embargo, para evaluar el estado del equipo en el momento de este experimento se estableció la precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad y *carry over*, de acuerdo con la Guía de Validación de

Métodos Bioanalíticos de la EMA (2011). En este estudio, estos 5 parámetros fueron evaluados en un rango de concentración de 0 a 2 μM y cada parámetro de validación se define a continuación.

a) Precisión y exactitud

La precisión describe la cercanía de las medidas individuales repetidas del analito. Se calculó como coeficiente de variación (CV) expresada en porcentaje en un mismo día de experimento (intra-ensayo) o en tres días diferentes (inter-ensayo). Se aceptó un CV dentro del límite de $\pm 15\%$.

La exactitud refleja la proximidad entre la concentración nominal del analito (CT) y la concentración obtenida por el método analítico (CM) en un mismo día de experimento. Esta fue estimada de acuerdo con la siguiente ecuación, aceptando una variación dentro del límite de $\pm 15\%$.

$$\text{Bias (\%)} = \left(\frac{CT - CM}{CT} \right) \times 100$$

b) Linealidad

Se evaluó la linealidad en el rango de aplicación del método analítico a 0, 0,5, 1, 1,5 y 2 μM . Las curvas de calibración se construyeron representando gráficamente la relación del área de los picos de los triterpenos pentacíclicos con respecto al IS frente a la concentración de analitos. Los datos se analizaron mediante regresión lineal con el método de mínimos cuadrados determinando la pendiente, la intersección y el coeficiente de determinación (R^2).

c) Sensibilidad

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración que presenta una señal de al menos 5 veces a la presentada por el ruido de fondo y que puede ser cuantificada con una precisión y exactitud de un 20%. El límite de detección (LOD) se considera como la concentración mínima de los compuestos que puede reconocer el detector y producir una señal 3 veces superior al presentado por el ruido de fondo.

d) Carry-over

El *carry over* se evaluó de forma rutinaria seis veces en cada análisis inyectando secuencialmente el estándar de calibración más alto seguido de reactivos en blanco a intervalos regulares sobre la base del número total de muestras por experimento.

Material y métodos

3.6.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-MS

El análisis de los triterpenos pentacíclicos y compuestos fenólicos los de las aceitunas de la cosecha 2016-2017 que se utilizaron en el estudio preclínico sobre la presión arterial y que fueron consumidas por los voluntarios sanos en la intervención nutricional se realizó en un sistema Acquity UPLC (Waters) acoplado a un triple cuadrupolo API3000 (AB Sciex).

3.6.3.1. Análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017

a) Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas para la determinación de los triterpenos se han descrito en el apartado 3.6.2.1, con la salvedad que se utilizó el gradiente de elución de la Tabla 3.4.

En este equipo los solventes utilizados para limpiar el sistema de inyección fueron el lavado fuerte compuesto por agua Milli-Q y acetonitrilo 10:90 (v/v) a un volumen de 2,25 ml y el lavado débil que consistía en metanol y agua Milli-Q 80:20 (v/v) a un volumen de 0,60 ml.

Tabla 3.4. Gradiente de elución para la determinación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas cosecha 2016-2017 por LC-MS.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	17,0	83,0
22,5	17,0	83,0
23,0	0,00	100,0
27,0	0,00	100,0
27,5	17,0	83,0
33,0	17,0	83,0

b) Condiciones de espectrometría de masas

La ionización de los triterpenos se llevó a cabo utilizando una fuente APCI mantenida a 500°C en modo negativo (de 0 a 16 minutos) para los triterpenos pentacíclicos ácidos: maslínico, oleanólico y ursólico y para el IS, el ácido betulínico. Para los triterpenos pentacíclicos alcoholes: el eritrodíol y el uvaol; la fuente de ionización se mantuvo a 450°C en modo positivo (de 17 a 33 minutos). La fuente APCI utilizó las siguientes condiciones: N₂ como gas nebulizador a 10 ua, como cortina de gas a 12 ua y como gas de colisión a -3 y +3 ua para modo de iones negativo y positivo, respectivamente. El ajuste óptimo de las condiciones se estableció, según el método establecido por Moreno-González *et al.* (2020), mediante la infusión directa de cada triterpeno a una concentración de 50 µM (Tabla 3.5). El análisis se realizó utilizando el modo SIM, determinando el ácido maslínico como iones [M-H]⁻ a un *m/z* de 471,3 y el ácido oleanólico, ursólico y betulínico (IS) como iones [M-H]⁻ a *m/z* de 455,3. El tiempo de

permanencia de 1000 ms se empleó para todos ellos. Por otra parte, el eritrodiol y el uvaol fueron monitoreados como iones $[M+H-H_2O]^+$ a m/z de 425,3 con un tiempo de permanencia de 4000 ms.

Tabla 3.5. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada triterpeno pentacíclico y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-APCI-MS para el análisis en aceitunas de la cosecha 2016-2017 en el instrumento API3000.

Triterpeno pentacíclico	Tiempo de retención (min)	m/z	DP (V)	FP (V)	EP (V)
Ácido maslínico	5,90	471,3	-50,0	-170	-10,0
Ácido oleanólico	12,8	455,5	-50,0	-170	-10,0
Ácido ursólico	14,0	455,5	-50,0	-170	-10,0
Ácido betulínico, IS	11,6	455,5	-50,0	-170	-10,0
Eritrodiol	17,8	425,7	+40,0	+160	+10,0
Uvaol	19,3	425,7	+40,0	+160	+10,0

Cociente masa/carga (m/z), potencial de desagrupamiento (DP), potencial de enfoque (FP), potencial de entrada (EP).

3.6.3.2. Análisis de polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017

a) Condiciones cromatográficas

Las condiciones descritas por Moreno-González *et al.* (2020) se utilizaron para analizar los polifenoles. Así, se empleó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 con dimensiones de 150 x 4,60 mm (largo x ancho) y tamaño de partícula de 5 μ m mantenida a 30°C. La entrada de la columna se protegió con el uso de una precolumna Zorbax Eclipse XDB-C18, de dimensiones 12,5 x 4,60 mm y mismo tamaño de partícula. La columna y la precolumna fueron proporcionadas por Agilent Technologies (California, EUA).

El UPLC estaba equipado con una bomba binaria, un sistema de inyección automático que permite mantener los viales a 10°C y un sistema de desgasificación continua. La fase móvil consistió en la fase acuosa (fase A) que contenía agua Milli-Q con ácido acético al 0,025% y la fase orgánica (fase B) que contenía acetonitrilo con acetona al 5% que eluyeron a una velocidad de flujo de 0,80 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 μ l y la separación cromatográfica se realizó con el gradiente de elución indicado en la Tabla 3.6.

Material y métodos

Tabla 3.6. Gradiente de elución para la determinación de polifenoles en aceitunas cosecha 2016-2017 por LC-MS.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	97,5	2,50
2,00	97,5	2,50
3,00	90,0	10,0
8,00	35,0	65,0
8,50	0,00	100,0
10,5	0,00	100,0
11,0	97,5	2,50
11,5	97,5	2,50

El *carry over* se evitó con un programa de 3 ciclos de lavado que consistían en 2 minutos de 100% de fase orgánica intercalada con el reequilibrio a las condiciones iniciales. Finalmente, se volvió a equilibrar el sistema a las condiciones iniciales durante 6 minutos antes de la siguiente inyección. Los solventes utilizados para lavar la aguja del inyector (5 ml cada uno) se integraron por el lavado fuerte que consistió en 2-propanol: tetrahidrofurano: agua Milli-Q (1:1:1; v/v) mientras que el lavado débil estuvo compuesto por una proporción de agua Milli-Q y acetonitrilo (90:10, v/v).

b) Condiciones de espectrometría de masas

La ionización de los polifenoles se realizó utilizando una fuente ESI en modo negativo con una temperatura establecida de 350°C. El MS fue utilizado en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) con 60,0 ms como tiempo de permanencia para la transición del cuantificador y 10,0 ms para la transición del identificador. La fuente ESI se utilizó con las siguientes configuraciones: N₂ como gas nebulizador a 10 ua, como cortina de gas a 12 ua y como gas de colisión a 4 ua. El voltaje de ionización fue de -4200 V. La fragmentación y transiciones MRM de cada compuesto se optimizó, según el método establecido por Moreno-González *et al.* (2020), mediante la infusión directa de cada polifenol a 50 µM con una jeringa Modelo 11 (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA) a una velocidad de flujo de 10 µl/min (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada polifenol y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-ESI-MS/MS para el análisis en aceitunas de la cosecha 2016-2017 en el instrumento API3000.

Polifenol	Tiempo de retención (min)	Ion padre (m/z)	Fragmento (m/z)		DP (V)	EP (V)	CE (V)	
			Q	I			Q	I
Apigenina	9,00	269,1	117,1	151,1	65,0	10,0	48,0	34,0
Ácido cafeico	7,04	179,1	135,2	107,1	40,0	5,00	25,0	35,0
Ácido <i>p</i> -cumárico	7,61	163,1	119,2	93,0	40,0	4,50	20,0	40,0
Ácido vanílico	7,15	167,1	108,0	152,0	50,0	6,00	25,0	20,0
Catecol	7,28	108,8	91,0	65,0	53,0	10,0	29,0	36,0
Hidroxitirosol	6,30	153,0	123,0	95,0	40,0	5,00	25,0	25,0
Hidroxitirosol acetato	8,06	195,0	59,1	135,1	40,0	4,50	25,0	15,0
Luteolina	8,46	285,0	133,0	151,0	75,0	10,5	50,0	35,0
Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido	7,12	447,2	285,0	327,0	80,0	10,5	40,0	35,0
Oleuropeína	7,59	539,5	275,0	307,0	50,0	11,0	33,0	33,0
(+)-Pinoresinol	8,71	357,1	151,1	135,9	70,0	6,50	45,0	25,0
Quercetina	8,55	301,0	151,0	179,1	55,0	4,50	30,0	25,0
Rutina	6,91	609,0	301,0	271,0	55,0	10,5	50,0	80,0
Salidroside	6,21	299,1	119,0	89,0	50,0	4,50	20,0	20,0
Tirosol	6,87	137,1	106,1	118,8	45,0	4,50	25,0	25,0
Verbascósido	6,99	623,5	161,1	461,2	85,0	10,0	50,0	40,0
2-(3-hidroxifenil)-etanol, IS	7,15	137,0	107,0		40,0	5,00	20,0	

Cociente masa/carga (*m/z*), cuantificador (Q), identificador (I), potencial de desagrupamiento (DP), potencial de entrada (EP), energía de colisión (CE).

3.6.3.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017

Las soluciones de trabajo para cuantificar los triterpenos y polifenoles en aceitunas se prepararon a una concentración de 1 y 10 μM . Estas contenían los 5 triterpenos pentacíclicos o los 16 polifenoles en metanol al 80% como disolvente de dilución. A partir de las soluciones de trabajo se prepararon 3 réplicas de cada punto de la curva de calibración a concentraciones finales de 0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 μM , utilizando el método de adición del estándar que consiste en agregar estas concentraciones de los compuestos directamente a las alícuotas de las suspensiones de aceitunas filtradas. Los filtrados de aceitunas se diluyeron a la misma concentración que las muestras: 1/50 para la cuantificación de hidroxitirosol, verbascósido, ácido maslínico y ácido oleanólico; 1/4 para la determinación de los otros

Material y métodos

polifenoles; y no diluidos para determinar eritrodiol y para evaluar la presencia de ácido ursólico y uvaol.

Las muestras y la curva de calibración fueron analizadas por LC-MS y, a continuación, los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles se identificaron comparando los tiempos de retención de cada compuesto con los presentados por los estándares en sus correspondientes m/z . Finalmente, el área del analito o el área ratio (calculada mediante la relación del área del pico del analito con la del IS) fueron interpoladas frente a las curvas de calibración para obtener las concentraciones de cada triterpeno pentacíclico y cada polifenol. Los resultados se expresaron en mg del compuesto/kg de aceitunas deshuesadas.

3.6.3.4. Validación del método utilizado para el análisis triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-MS

El método se validó de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, 2011), evaluando así la precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad y *carry over* tal como se ha descrito en el apartado 3.6.2.3. En este estudio, estos 5 parámetros fueron evaluados en un rango de concentración de 0 a 3 μM para los triterpenos y de 0 a 2 μM para los polifenoles.

3.7. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata

3.7.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial

Las ratas SD utilizadas en el estudio farmacocinético, así como las cepas WKY y SHR usadas en el estudio del efecto del consumo de aceitunas en la presión arterial, fueron alimentadas con una dieta estándar (2014 Teklad Global 14%). Los triterpenos pentacíclicos y polifenoles del pienso se extrajeron siguiendo el método establecido y validado para la extracción de ambos compuestos en aceitunas de Moreno-González *et al.* (2020). Para ello, 5 g de pienso (aproximadamente 3 a 4 pellets) de 2 sacos diferentes fueron triturados con ayuda de un mortero. Posteriormente, el pienso se colocó en un tubo falcón de 50 ml y se trituró mediante el uso de un Polytron® acoplado al brazo 20 TS (Kinematica AG) realizando 5 ciclos de 30 segundos a una velocidad de 3. En todo momento, el tubo falcón se mantuvo sumergido en hielo y entre cada ciclo se realizó una pausa de 1 minuto. Al finalizar, el brazo del Polytron® se limpió cuidadosamente como se describe en el apartado 3.5.3.

Posteriormente, se colocó 1 g de pienso triturado en un tubo falcón de 15 ml y se agregaron 6 ml de etanol-metanol (1:1, v/v) desglosados de la siguiente forma: 3 ml de etanol (100%), 2,96 ml de metanol (100%), 0,02 ml de ácido betulínico (600 μM , IS de los triterpenos) y 0,02 ml de 2-(3-hidroxifenil)-

etanol (600 μM , IS de los polifenoles) ambos patrones internos fueron disueltos en metanol 80%. La primera extracción se realizó mediante la mezcla de la muestra en un vórtex durante 5 minutos y centrifugación a 3345xg durante 30 minutos a 4°C (Centrifuge Megafuge 1.0). El sobrenadante fue recogido y se colocó en un nuevo tubo falcón de 15 ml para someterse a una segunda y tercera extracción con 3 ml de etanol-metanol (1:1, v/v). Los sobrenadantes de las 3 extracciones se reunieron en un nuevo tubo falcón y se mezclaron en vórtex. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 procesos de centrifugación: el primero se realizó a 3345xg durante 20 minutos a 4°C (Centrifuge Megafuge 1.0); mientras que, en la segunda centrifugación, se colocaron alícuotas de 2 ml en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 25000xg durante 30 minutos a 2°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG). Al final de la extracción, la concentración final del IS de los triterpenos pentacíclicos (el ácido betulínico) y del IS de los polifenoles (el 2-(3-hidroxifenil)-etanol) fue de 1 μM . Por último, los sobrenadantes fueron filtrados (filtros de jeringa PTFE de 0,45 μM), y se colocaron en viales ámbar sin inserto almacenándose a 4°C protegidos de la luz hasta su análisis por LC-MS (Figura 3.4).

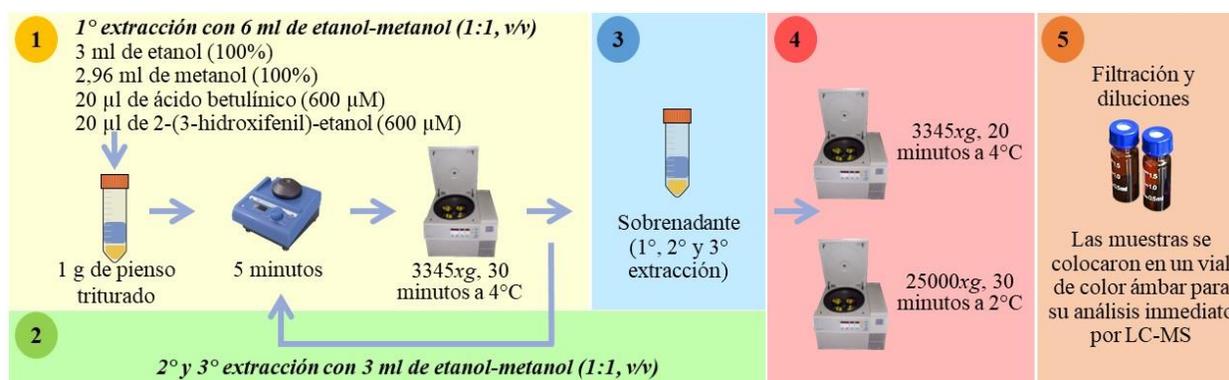


Figura 3.4. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata.

3.7.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial

El análisis de los triterpenos pentacíclicos y los compuestos fenólicos en el pienso comercial se realizó en un sistema Acquity UPLC (Waters) acoplado a un triple cuadrupolo API3000 (AB Sciex), tal como se describe en el apartado 3.6.3. Los resultados se expresaron en mg del compuesto/kg de pienso.

3.8. Concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Arbequina

3.8.1. Diseño experimental del estudio farmacocinético en ratas Sprague-Dawley

En este estudio, se seleccionaron 13 ratas macho SD de 250-350 g que se mantuvieron en cuarentena una semana antes del inicio del experimento. En todo momento, los animales se mantuvieron en

Material y métodos

condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Todas las ratas fueron alimentadas con dieta estándar (2014 Teklad Global 14%, Envigo Rms) y agua *ad libitum*. Los animales se dividieron aleatoriamente en jaulas ($n= 2/\text{jaula}$) formando 2 grupos que recibirían 3,85 g ($n= 6$) o 7,70 g ($n= 7$) de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal en forma de suspensiones orales. Estas suspensiones fueron preparadas con las aceitunas de la cosecha 2015-2016 como se indica en el apartado 3.5.3.

3.8.2. Extracción de muestras sanguíneas

Las ratas fueron puestas en ayuno una noche antes de comenzar con la administración de las dosis de 3,85 g ($n= 6$) o 7,70 g ($n= 7$) de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal. La administración se realizó por sonda oral a un volumen de 10 ml/kg de peso corporal de la rata, con un tubo de alimentación de acero inoxidable para animales (calibre 18×76 mm, ref. FTSS-18S-76, Instech Laboratories, Inc., Pensilvania, EUA). Posteriormente, se obtuvieron 4 muestras de sangre por rata, cada muestra de un volumen aproximado de 0,45 ml, por lo que se obtuvo un máximo de 1,8 ml de sangre de un solo animal. Este volumen representa el 10% del total de sangre circulante, cantidad que se puede extraer de forma segura en 24 horas sin influir en el hematocrito. La sangre fue recogida en tubos que contenían EDTA-K₂ como anticoagulante (Microvette CB300, Sarstedt, Barcelona, España), mediante punción de las venas safenas laterales a las 0,5, 1, 1,5, 2, 3 y 4 horas después de la dosificación y la última muestra de sangre (6 u 8 horas) fue obtenida por punción cardíaca (Figura 3.5).

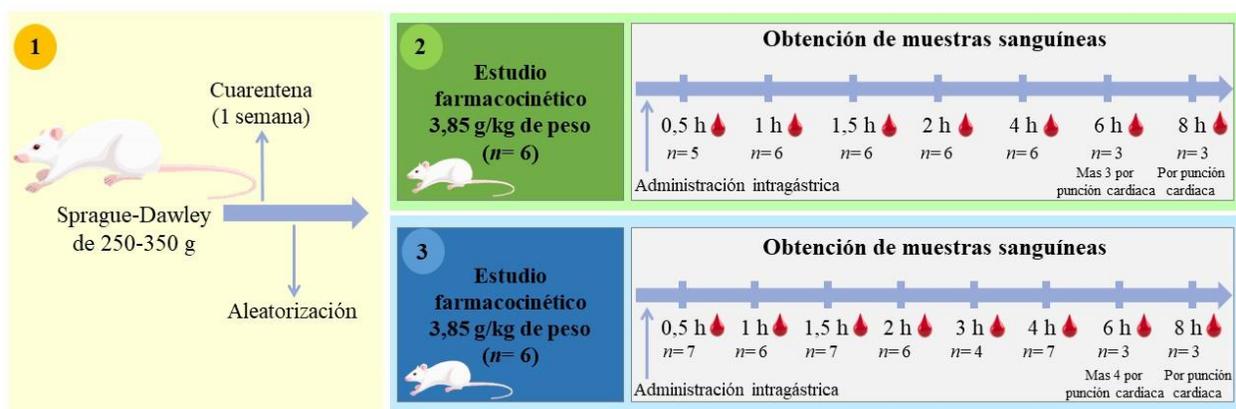


Figura 3.5. Diseño experimental del estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos derivados de las aceitunas en ratas Sprague-Dawley.

Cada punto de tiempo estuvo conformado por 3 a 7 repeticiones. En el último tiempo de cada estudio la extracción de sangre se realizó por punción cardíaca, por lo que las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de clorhidrato de ketamina (Imalgene®; Merial, Lyon, Francia) y

clorhidrato de xilacina (Rompun®; Bayer Hispania SL, Sant Joan Despí, España) a una proporción 9:1. Antes de realizar la punción cardíaca se comprobó la profundidad de la anestesia determinada por la ausencia de reflejos podales y palpebrales. Una vez se produjo la extracción de sangre por punción cardíaca, se procedió a la eutanasia mediante dislocación cervical. El plasma se obtuvo inmediatamente por centrifugación a 3345xg (Centrifuge Megafuge 1.0) durante 15 minutos a 4°C y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

3.8.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS

3.8.3.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley

Se utilizó el proceso de extracción líquido-líquido previamente establecido y validado para triterpenos pentacíclicos (Giménez *et al.*, 2017) y que fue posteriormente adaptado por Kundisova *et al.* (2020). De este modo, se colocaron 200 µl de plasma en un tubo falcón de 15 ml y se adicionaron 10 µl de ácido ascórbico al 10% (recién preparado), 10 µl de ácido betulínico (2 µM) y 10 µl de ácido acético al 1%. La primera extracción se realizó con la incorporación de 2 ml de acetato de etilo a cada muestra. Después, las muestras se mezclaron en un vórtex durante 5 minutos, se colocaron en un baño de ultrasonidos (Fungilab) por 10 minutos y se centrifugaron a 3345xg durante 30 minutos a 2°C (Centrifuge Megafuge 1.0). Se recogió el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo falcón de 15 ml. El sedimento residual se sometió a una segunda extracción con 2 ml de acetato de etilo y el proceso se repitió en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los 2 sobrenadantes se mezclaron y se añadieron 10 µl de ácido ascórbico al 10% antes de la evaporación a sequedad a 45°C (Concentrador 5301, Eppendorf Ibérica S.L.).



Figura 3.6. Extracción de triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas SD.

Material y métodos

El residuo se reconstituyó con 80 μ l de metanol al 100%, se mezcló en vórtex durante 5 minutos y se añadieron 20 μ l de agua Milli-Q. Después de la reconstitución del residuo, las concentraciones finales del ácido betulínico fueron de 0,2 μ M. Posteriormente, las muestras se colocaron en un baño de ultrasonidos (Fungilab) durante 2 minutos y se centrifugaron a 3345xg, durante 10 minutos a 2°C (Centrifuge Megafuge 1.0). Finalmente, y con el objetivo de eliminar las partículas sólidas residuales, las muestras se centrifugaron a 25000xg durante 30 minutos a 2°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG). Los sobrenadantes se colocaron en viales ámbar con inserto y se almacenaron a 4°C protegidos de la luz hasta el análisis por LC-MS (Figura 3.6).

3.8.3.2. Análisis de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley

Para el análisis de los triterpenos pentacíclicos en plasma de rata SD se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies) acoplado a un sistema QTRAP 4000 (AB Sciex) y empleando las condiciones descritas en el apartado 3.6.2.1. Además de analizar los triterpenos pentacíclicos como se describe en la Tabla 3.3, también se investigó la posible presencia de metabolitos de los compuestos principales, los ácidos maslínico y oleanólico. Por este motivo, se investigaron las masas correspondientes a metabolitos de fase I y de fase II descritos en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada metabolito de los triterpenos pentacíclicos establecidos u obtenidos por LC-APCI-MS para el análisis en plasma de ratas SD en el instrumento QTRAP 4000.

Metabolitos de los triterpeno pentacíclicos	<i>m/z</i>	DP (v)	FP (v)	EP (v)
Ácido maslínico-OH	487,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-OH-(-2H)	485,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-2OH	503,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-2OH-(-2H)	501,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-SO ₄	551,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-OH-SO ₄	567,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-OH-(-2H)-SO ₄	565,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-Glu	647,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-OH-Glu	663,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido maslínico-OH-(-2H)-Glu	661,3	-50,0	-175	-10,0
Ácido oleanólico-OH	471,5	-50,0	-150	-10,0
Ácido oleanólico-OH-(-2H)	469,5	-50,0	-150	-10,0
Ácido oleanólico-SO ₄	535,5	-50,0	-150	-10,0

Cociente masa/carga (*m/z*), adición de un grupo hidroxilo (OH), adición de dos grupos hidroxilo (2OH), pérdida de dos hidrógenos (-2H), adición de un ácido glucurónico (Glu), adición de un grupo sulfato (SO₄), potencial de desagrupamiento (DP), potencial de enfoque (FP), potencial de entrada (EP).

Debido a la ausencia de estándares sintéticos, la determinación de los metabolitos de los triterpenos pentacíclicos en el plasma de ratas SD se realizó siguiendo los parámetros de espectrometría del compuesto padre, asumiendo que tienen una respuesta LC-MS similar.

3.8.3.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley

Las soluciones de trabajo que contenían los 5 triterpenos se elaboraron en metanol al 80% como disolvente de dilución a las concentraciones de 0,2 a 3,0 μM . La recta patrón se construyó con estándares de calibración que se elaboraron utilizando plasma de ratas que no habían sido administradas con aceitunas. Así, el plasma blanco se obtuvo previamente de animales en ayunas y se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta el momento del análisis.

Cada punto de la curva de calibración se preparó por triplicado a las concentraciones finales de 0, 10, 25, 50, 100 y 150, nM que se sometieron al procedimiento de extracción descrito en el apartado 3.8.3.1. Los triterpenos pentacíclicos se identificaron comparando el tiempo de retención de cada compuesto con el obtenido por su estándar en su correspondiente m/z . A continuación, la concentración se calculó interpolando el área ratio de cada triterpeno frente a su respectiva curva de calibración externa. Debido a la ausencia de estándares sintéticos, la concentración de los metabolitos de los triterpenos pentacíclicos se calculó utilizando la curva de calibración del compuesto padre asumiendo que tienen una respuesta LC-MS similar. Los resultados se expresaron en nM.

3.8.3.4. Validación del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS

El análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de rata se validó de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, 2011), evaluando así la precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad y *carry over* tal como se ha descrito en el apartado 3.6.2.3. Además de estos parámetros, también se evaluó la recuperación, el efecto matriz y la sensibilidad del método.

Para la validación del método se utilizaron los estándares de calibración elaborados mediante la adición al plasma blanco de concentraciones crecientes de triterpenos pentacíclicos, en el rango de aplicación del método analítico (10, 25, 50, 100 y 150 nM). Los estándares de calibración se prepararon por triplicado para cada concentración y se extrajeron del mismo modo que las muestras de plasma procedentes de las ratas administradas (apartado 3.8.3.1).

Material y métodos

a) Recuperación y efecto matriz

La recuperación y el efecto matriz se analizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Matuszewski *et al.* (2003). La recuperación se define como el porcentaje del analito que se encuentra originalmente en la muestra y que se detecta al final del procedimiento. El efecto matriz se refiere a la diferencia en la respuesta de espectrometría de masa de un analito en solución estándar *versus* la respuesta para el mismo analito en una matriz.

Para evaluar estos parámetros se prepararon 3 conjuntos de soluciones estándar de los triterpenos pentacíclicos a 2 niveles de concentración, 25 y 100 nM. En el primer conjunto (C1) los triterpenos se diluyeron en metanol al 80%. En el segundo conjunto (C2) los triterpenos fueron agregados al plasma blanco después del proceso de extracción. En el tercer conjunto (C3) los triterpenos fueron agregados al plasma blanco antes de la extracción. Estos conjuntos fueron analizados por LC-MS para después calcular sus áreas ratio y estimar la recuperación (RE) y el efecto matriz (ME) con las siguientes fórmulas:

$$RE (\%) = \left(\frac{C3}{C2} \right) \times 100$$

$$ME (\%) = \left(\frac{C2}{C1} \right) \times 100$$

b) Selectividad

La selectividad se evaluó para poder establecer si el método analítico es capaz de diferenciar los triterpenos pentacíclicos y el IS de los compuestos endógenos del plasma. Por lo tanto, se compararon 6 muestras independientes, sin analitos ni IS, con las fortificadas con triterpenos pentacíclicos a las concentraciones de 150 nM. En estas muestras el IS (ácido betulínico) estaba en una concentración de 200 nM.

3.8.4. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos derivados de aceitunas en ratas Sprague-Dawley

Las concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos a lo largo del tiempo se analizaron siguiendo un enfoque no compartimental utilizando el software Phoenix 64 versión 8.1 (Cetara TM, Pharsight Corporation, Princeton, EUA). Las concentraciones plasmáticas inferiores al LOQ no se consideraron para el análisis.

Las áreas bajo la curva (AUC) se calcularon siguiendo el método lineal-log trapezoidal. Este método utiliza la regla trapezoidal lineal hasta la concentración plasmática máxima (C_{max}) y luego la regla trapezoidal logarítmica para el resto de la curva de concentración.

Los siguientes parámetros farmacocinéticos fueron calculados para cada dosis oral:

- T_{max} : tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima del compuesto.
- C_{max} : concentración máxima observada que ocurre en el T_{max} .
- $AUC_{extrap\%}$: porcentaje del $AUC_{(0-\infty)}$ debida a la extrapolación de T_{last} al infinito. Se calcula por la siguiente fórmula:

$$AUC_{extrap\%} = \frac{AUC_{(0-\infty)} - AUClast}{AUC_{(0-\infty)}} \times 100$$

- $AUC_{(0-\infty)}$: área bajo la curva de la concentración plasmática desde el momento cero hasta el infinito según la última concentración predicha. Su estimación se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$AUC_{(0-\infty)} = AUClast + \frac{Clast}{\lambda_z}$$

- $AUClast$: área bajo la curva de la concentración plasmática desde el momento de la dosificación hasta la última concentración cuantificable.
- λ_z : constante de velocidad terminal estimada a partir de la pendiente de la fase terminal en la gráfica de las concentraciones plasmáticas en escala logarítmica frente al tiempo.
- $t_{1/2}$: se refiere a la vida media terminal. Se calcula de la siguiente manera:

$$T_{1/2} = 0.693/\lambda_z$$

- MRT_{∞} : tiempo medio de residencia extrapolado al infinito. Para la dosificación extravascular este parámetro incluye el tiempo medio de entrada y el tiempo en la circulación sistémica. Su estimación se realiza mediante la fórmula siguiente, donde $AUMC_{(0-\infty)}$ se refiere al área bajo la curva del primer momento extrapolada al infinito, basada en la última concentración predicha.

$$MRT_{\infty} = \frac{AUMC_{(0-\infty)}}{AUC_{(0-\infty)}}$$

- MTR_{last} : tiempo medio de residencia desde el momento de la dosificación hasta el momento de la última concentración medible. La fórmula para estimar este parámetro es la siguiente:

$$MTR_{last} = \frac{AUMClast}{AUClast}$$

Material y métodos

3.9. Efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina en la presión arterial y el peso corporal en ratas normotensas e hipertensas

3.9.1. Diseño experimental del estudio de la presión arterial

Las ratas normotensas (WKY) e hipertensas (SHR) de 9 semanas de edad se mantuvieron en cuarentena por una semana y, posteriormente, se distribuyeron aleatoriamente en grupo control y grupo de administración de 3,85 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal, obteniendo los 4 grupos de estudio siguientes: WKY control ($n=6$), WKY aceitunas ($n=8$), SHR control ($n=7$) y SHR aceitunas ($n=8$) (Figura 3.7). A continuación, se registró la presión arterial diariamente durante 2 semanas como un entrenamiento para aclimatar a los animales al procedimiento y para asegurar que los valores de la presión arterial se ajustaran a los criterios aceptados para la normotensión e hipertensión establecidos por Okamoto y Aoki (1963), investigadores desarrolladores de la cepa SHR.

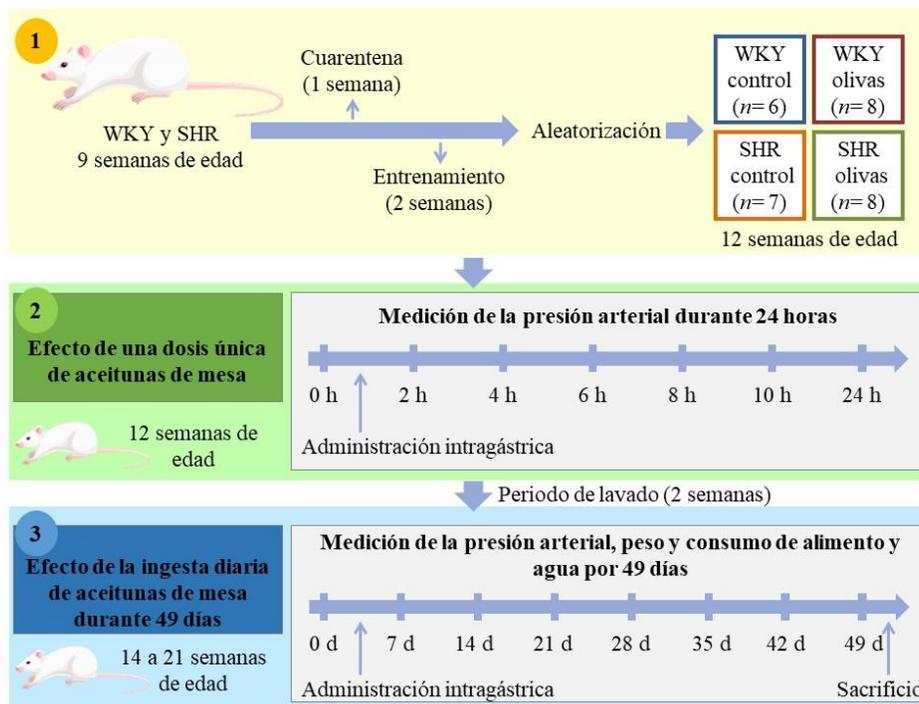


Figura 3.7. Diseño experimental del estudio del efecto de las aceitunas en la presión arterial de ratas WKY y SHR.

El efecto de las aceitunas Arbequina en la presión arterial se investigó mediante dos experimentos independientes. En el primer estudio, la suspensión de aceitunas se administró en una dosis única y el efecto sobre la presión arterial se evaluó durante 24 horas. En el segundo experimento, la suspensión de aceitunas se administró en dosis repetidas y se evaluó el efecto en la presión arterial durante 49 días

(Figura 3.7). En ambos estudios, se utilizó la cosecha de aceitunas del 2016-2017 y la dosis de la suspensión de aceitunas o agua se ajustó de acuerdo con el peso corporal diario de cada animal. La administración intragástrica se realizó mediante sonda oral con un tubo de alimentación animal de acero inoxidable (calibre 18 × 76 mm, ref. FTSS-18S-76, Instech Laboratories, Inc).

3.9.2. Efecto de una dosis única de aceitunas

La evaluación del efecto a corto plazo de una dosis única de aceitunas sobre la presión arterial se evaluó en ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad. El experimento consistió en medir la presión arterial basal entre las 8:00 y las 10:00 horas y a las 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas después de la administración de agua o de la suspensión de aceitunas en una habitación insonorizada.

3.9.3. Efecto de la ingesta diaria de aceitunas durante 49 días

El estudio a largo plazo se realizó en ratas WKY y SHR después del experimento a corto plazo y de un período de lavado de 2 semanas. En este estudio se evaluó durante 49 días el efecto de la ingestión diaria de aceitunas sobre la presión arterial de ratas de 14 a 21 semanas de edad. La presión arterial se midió una vez a la semana entre las 08:00 y las 10:00 horas y la administración oral de aceitunas o agua se realizó diariamente entre las 17:00 y las 18:00 horas para minimizar los efectos de cualquier ritmo circadiano. En este estudio las aceitunas se trituraron cada dos días. Dentro de este ensayo se controló el peso corporal todos los días, se midió la ingesta de agua y alimentos cada semana y se calculó la eficiencia de conversión alimenticia a partir del aumento de peso corporal semanal dividido por el consumo de alimentos. La eficiencia de conversión alimenticia fue expresada como porcentaje.

3.9.4. Medición de la presión arterial

La presión arterial se midió en ratas conscientes y retenidas en un soporte, por el método del manguito de cola, con el medidor de presión arterial no invasivo (LE5001 Panlab; Harvard apparatus, Barcelona, España). Con el objetivo de que las pulsaciones de la arteria de la cola fueran detectables por el transductor las ratas se mantuvieron a una temperatura ambiente de 30°C durante 10 minutos antes de cada medición (Buñag, 1973). Para lo anterior, se utilizaron una esterilla térmica y una lámpara de infrarrojos y la temperatura en la jaula se monitorizó con un termómetro digital (termómetro Demestres 305, Barcelona, España) como puede observarse en la Figura 3.8.

Material y métodos

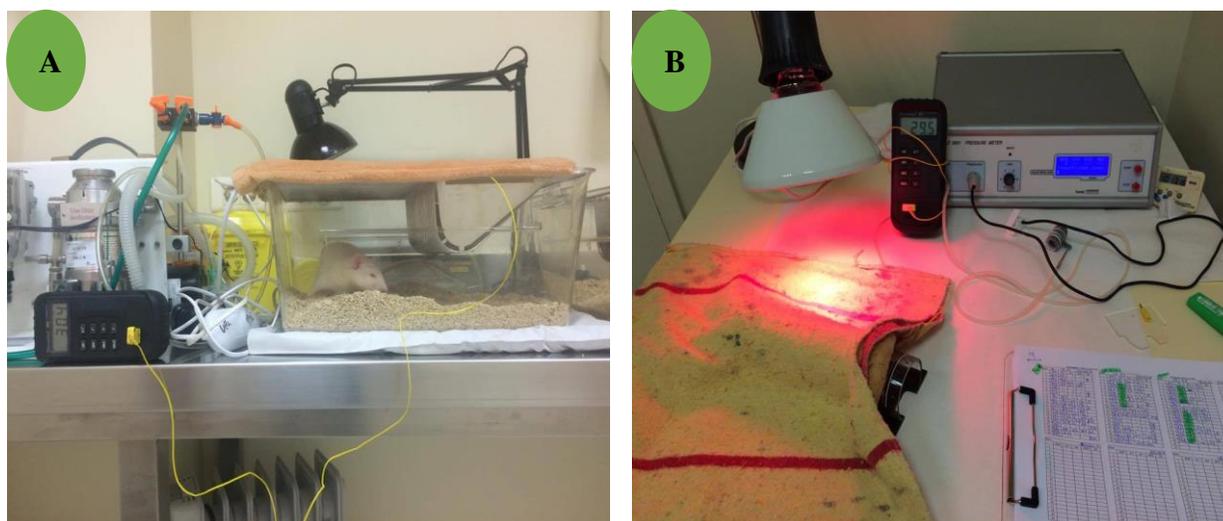


Figura 3.8. Metodología para medir la presión arterial. A) Las ratas se mantuvieron a 30 °C antes de cada medición. B) Las ratas se colocaron en un soporte y se midió la presión arterial por el método del manguito de cola.

Todas las determinaciones de presión arterial fueron realizadas por la misma persona en el mismo ambiente apacible con el objetivo de eliminar las variaciones inducidas por el estrés. Se realizaron al menos 7 determinaciones por rata en cada sesión y se calculó la media de estos valores para obtener el promedio de la presión arterial sistólica, diastólica y media en cada grupo. La presión arterial media la provee el propio medidor de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$PA \text{ media} = PA \text{ diastólica} + (PA \text{ sistólica} + PA \text{ diastólica}) \times 0,33$$

3.9.5. Extracción de muestras sanguíneas y necropsia

Después de 49 días de ingestión diaria de aceitunas o agua, las ratas se colocaron en ayunas durante la noche. A la mañana siguiente, los animales fueron anestesiados por inyección intramuscular con clorhidrato de ketamina (Imalgene®; Merial) y clorhidrato de xilacina (Rompun®; Bayer Hispania SL) a una dosis de 90 y 10 mg/kg, respectivamente. Cuando el animal estuvo en anestesia profunda comprobada por la ausencia de reflejo podal y palpebral, se procedió a la extracción de sangre por punción cardíaca.

Las muestras de sangre se obtuvieron entre 16 y 20 horas después de la última administración de aceitunas o agua y se transfirieron a tubos con EDTA-K₂. El plasma se obtuvo por centrifugación a 3345xg durante 15 minutos a 4°C (Centrifuge Megafuge 1.0) y fue inmediatamente colocado en tubos eppendorf de 500 µl que fueron sumergidos en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlos a -80°C hasta el análisis de los triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos por LC-MS.

Posteriormente, se realizó una exploración cuidadosa de la superficie externa del cuerpo, los orificios y las cavidades torácica y abdominal. Los riñones, el hígado, el corazón, el bazo y los pulmones fueron extirpados y recortados de cualquier tejido adherente. Los depósitos adiposos se recolectaron como se describió previamente por Johnson y Hirsch (1972) y como se detallan a continuación. Se retira el depósito omental que se localiza entre el bazo y el estómago. La almohadilla retroperitoneal izquierda se recoge como una sección triangular que se extiende desde un vértice en la región inguinal hasta la línea media y a través del polo inferior del riñón, extendiéndose lateralmente hasta donde la grasa sea visible. La almohadilla epididimaria izquierda se retira desde la parte distal hasta el vaso sanguíneo principal en la base del tejido graso. Todos los tejidos extraídos se lavaron en solución salina, se secaron ligeramente en papel de filtro y se pesaron inmediatamente para obtener el peso húmedo. Los resultados se expresaron en mg de órgano/g de peso corporal.

3.9.6. Determinación de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS

Para el análisis de los triterpenos pentacíclicos y los compuestos fenólicos en plasma de rata WKY y SHR se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies) acoplado a un sistema QTRAP 4000 (AB Sciex).

3.9.6.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR

Se utilizó el proceso de extracción líquido-líquido descrito en el apartado 3.8.3.1. Este método permite la extracción simultánea tanto de triterpenos pentacíclicos como de polifenoles. Por lo que la única diferencia con el proceso descrito anteriormente consiste en la adición del IS para el análisis de polifenoles además del IS para el análisis de triterpenos pentacíclicos (Figura 3.9). De esta manera, se adicionaron 10 µl de 2-(3-hidroxifenil)-etanol a la concentración inicial de 10 µM.



Figura 3.9. Extracción de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR.

Material y métodos

3.9.6.2. Análisis de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR

Los triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas WKY y SHR se analizaron en el cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies) acoplado a un sistema QTRAP 4000 (AB Sciex), empleando las condiciones descritas en el apartado 3.6.3.1. Los metabolitos de los ácidos maslínico y oleanólico se determinaron tal como se ha descrito en el apartado 3.8.3.2.

3.9.6.3. Análisis de polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR

a) Condiciones cromatográficas

Las condiciones de LC-MS descritas por Kundisova *et al.* (2020) se utilizaron para analizar los polifenoles. Una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) mantenida a una temperatura de 30°C y una precolumna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) de idénticas dimensiones mencionadas en el apartado 3.6.3.2 fueron utilizadas.

Aunque se utilizó la misma fase móvil que en el apartado 3.6.3.2, el gradiente fue diferente para adaptarlo al análisis de polifenoles en plasma. Así, el gradiente de elución compuesto por la fase acuosa (fase A) y la fase orgánica (fase B) se describe en la Tabla 3.9. La separación cromatográfica se realizó a una velocidad de flujo fue de 0,80 ml/min utilizando un volumen de inyección de 2 µl.

Tabla 3.9. Gradiente de elución para la determinación de polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,0	95,0	5,0
1,0	90,0	10,0
10,0	35,0	65,0
10,5	0,00	100,0
15,5	0,00	100,0
16,0	95,0	5,0
22,0	95,0	5,0

Para evitar el *carry over* se estableció un periodo de lavado a los 10,5 minutos con una duración de 5 minutos. Además, se programó un retraso de 6 minutos antes de la siguiente inyección para asegurar el equilibrio del sistema. Adicionalmente, el *carry over* fue evitado por el lavado de la aguja del inyector con 2-propanol: tetrahidrofurano: agua Milli-Q a una proporción de 1:1:1; v/v.

b) Condiciones de espectrometría de masas

La ionización de los polifenoles se realizó utilizando una fuente ESI en modo negativo con una temperatura establecida de 600°C y modo de MRM con 60,0 ms como tiempo de permanencia para la transición del cuantificador y 10,0 ms para la transición de identificación.

La fuente ESI se utilizó con las siguientes configuraciones: cortina de gas (N₂) a 25 ua; gas de fuente de iones 1 (gas de calentamiento de fuente, N₂) a 50 ua; gas de fuente de iones 2 (gas de secado, N₂) a 50 ua; y voltaje de ionización de -4500 V.

La fragmentación y transiciones MRM de cada compuesto se realizaron mediante la infusión directa de cada polifenol y el IS a 50 µM con una jeringa Modelo 11 (Harvard Apparatus) a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Posteriormente, los parámetros de espectrometría fueron optimizados para un aislamiento eficiente de los iones precursores y sus fragmentos selectivos (Tabla 3.10).

Por otra parte, y debido a la ausencia de estándares sintéticos, la determinación de los metabolitos de los polifenoles en el plasma de ratas WKY y SHR se realizó siguiendo los parámetros de espectrometría del compuesto padre asumiendo que tienen una respuesta LC-MS similar (Tabla 3.11).

Tabla 3.10. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada polifenol y al patrón interno establecidos u obtenidos por LC-ESI-MS/MS para el análisis en plasma de ratas WKY y SHR en el instrumento QTRAP 4000.

Polifenol	Tiempo de retención (min)	Ion padre (m/z)	Fragmento (m/z)		DP (V)		EP (V)	CE (V)		CXP (V)	
			Q	I	Q	I		Q	I	Q	I
Apigenina	10,66	269,0	117,1	151,1	-120	-100	-10,0	55,0	35,0	-10,0	-10,0
Ácido cafeico	7,09	179,1	135,1	107,1	-75,0	-75,0	-10,0	23,0	30,0	-10,0	-15,0
Ácido p-cumárico	8,09	163,2	119,2	93,2	-80,0	-80,0	-10,0	22,0	45,0	-15,0	-15,0
Ácido vanílico	7,07	167,0	152,0	157,9	-70,0	-70,0	-10,0	20,0	28,0	-10,0	-10,0
Catecol	7,32	109,0	91,2	65,0	-80,0	-82,0	-10,0	28,0	40,0	-10,0	-10,0
Hidroxitirosol	5,67	153,2	122,8	94,8	-78,0	-78,0	-10,0	20,0	30,0	-10,0	-15,0
Hidroxitirosol acetato	8,83	195,0	59,0	134,7	-85,0	-85,0	-10,0	17,0	20,0	-10,0	-10,0
Luteolina	9,79	285,2	133,2	151,9	-100	-110	-10,0	50,0	75,0	-10,0	-10,0
Luteolina 7-O-glucosido	7,54	447,3	285,2	327,1	-130	-130	-10,0	40,0	36,0	-15,0	-15,0
Oleuropeína	8,38	539,5	275,0	307,3	-190	-100	-10,0	30,0	30,0	-10,0	-10,0
(+)-Pinoresinol	10,13	357,3	151,1	136,1	-97,0	-97,0	-10,0	27,0	25,0	-10,0	-10,0
Quercetina	9,93	301,2	151,0	179,1	-110	-100	-10,0	30,0	35,0	-10,0	-10,0
Rutina	7,25	609,5	300,1	271,0	-300	-300	-10,0	50,0	75,0	-10,0	-15,0
Salidroside	5,77	299,2	119,2	89,3	-74,0	-74,0	-10,0	22,0	20,0	-15,0	-15,0
Tirosol	6,58	137,1	106,2	118,8	-70,0	-70,0	-10,0	20,0	20,0	-15,0	-15,0
Verbascósido	7,33	623,5	161,3	461,3	-140	-150	-10,0	50,0	48,0	-10,0	-10,0
2-(3-hidroxifenil)-etanol, IS	7,20	137,0	107,0		-70,0		-10,0	18,0		-15,0	

Cociente masa/carga (m/z), cuantificador (Q), identificador (I), potencial de desagrupamiento (DP), potencial de entrada del cuantificador y del identificador (EP), energía de colisión (CE), potencial de salida de la celda de colisión (CXP).

Material y métodos

Tabla 3.11. Parámetros de espectrometría de masa correspondientes a cada metabolito de los polifenoles establecidos u obtenidos por LC-ESI-MS/MS para el análisis en plasma de ratas WKY y SHR en el instrumento QTRAP 4000.

Metabolitos de los polifenoles	Ion padre (m/z)	Fragmento (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Hidroxitirosol-glucurónico	329,1	153,2	-78,0	-10,0	-20,0	-10,0
Hidroxitirosol-sulfato	233,0	153,2	-78,0	-10,0	-20,0	-10,0
Hidroxitirosol-sulfato-glucurónico	409,0	153,2	-70,0	-10,0	-10,0	-10,0
Hidroxitirosol acetato-glucurónico	371,0	195,0	-85,0	-10,0	-17,0	-10,0
Hidroxitirosol acetato-sulfato	275,0	195,0	-85,0	-10,0	-17,0	-10,0
Luteolina-glucurónico	461,2	285,2	-100	-10,0	-50,0	-10,0
Luteolina-sulfato	365,0	285,2	-100	-10,0	-50,0	-10,0
Tirosol-glucurónico	313,0	137,1	-70,0	-10,0	-20,0	-15,0
Tirosol-sulfato	217,0	137,1	-70,0	-10,0	-20,0	-15,0

Cociente masa/carga (m/z), potencial de desagrupamiento (DP), potencial de entrada del cuantificador y del identificador (EP), energía de colisión (CE), potencial de salida de la celda de colisión (CXP).

3.9.6.4. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR

Las soluciones de trabajo de ambos grupos de compuestos se elaboraron en metanol al 80% como disolvente de dilución el mismo día del procesamiento de las muestras. Para los triterpenos pentacíclicos se prepararon soluciones de trabajo a las concentraciones de 0,1 a 2,0 μM que contenían los 5 triterpenos. Por otra parte, para los polifenoles se prepararon a las concentraciones de 0,05 a 0,50 μM que contenían los 16 compuestos fenólicos. Posteriormente, se prepararon triplicados de cada punto de la curva de calibración a concentraciones finales de 0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 nM para el caso de los triterpenos pentacíclicos y de 0, 2,5, 5, 10, 15 y 25 nM para el caso de los polifenoles. Los estándares de calibración se prepararon de la siguiente forma: un volumen de 10 μl de las diferentes soluciones de trabajo fue agregados a alícuotas de 190 μl de plasma blanco, el cual se obtuvo de ratas sin ningún tratamiento con aceitunas o compuestos bioactivos. Los estándares de calibración se procesaron igual que las muestras de plasma. Los triterpenos pentacíclicos o polifenoles se identificaron comparando los tiempos de retención de cada compuesto con los obtenidos por los estándares de calibración en sus correspondientes m/z . La concentración de los analitos se calculó a partir de la interpolación del área ratio de cada triterpeno o polifenol frente a la curva de calibración correspondiente. Debido a la ausencia de estándares sintéticos, la concentración de los metabolitos de los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles se calculó utilizando la curva estándar del compuesto padre, asumiendo que tienen una respuesta LC-MS similar. Los resultados se expresaron en nM.

3.9.6.5. Validación del método de análisis conjunto de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS

El método de extracción conjunta de triterpenos pentacíclicos y polifenoles se validó siguiendo lo establecido en la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la EMA (2011). Los estándares de calibración preparados por triplicado en plasma blanco a las concentraciones finales de 0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 nM para el caso de los triterpenos pentacíclicos y 0, 2,5, 5, 10, 15 y 25 nM para el caso de los polifenoles, se utilizaron para estimar la precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad y *carry-over*. Los diferentes parámetros de validación de determinaron tal como se describe en el apartado 3.6.2.3.

3.10. Intervención nutricional: concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en voluntarios sanos después del consumo de aceitunas de la variedad Arbequina

3.10.1. Diseño experimental

Esta intervención nutricional fue realizada en un solo centro y se caracteriza por ser aleatorizada, abierta y cruzada a dos vías. Se compone de 2 etapas; la primera corresponde al estudio de la farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos en hombres sanos que consumieron una dosis de 60 y 120 aceitunas de la variedad Arbequina. En la segunda etapa se cuantificó la concentración plasmática de triterpenos después de 30 días del consumo diario de 60 aceitunas Arbequina por hombres y mujeres sanos. Las aceitunas utilizadas corresponden a la cosecha del 2016-2017. Durante el período de inclusión los sujetos siguieron una dieta restringida en alimentos ricos en triterpenos. Asimismo, el consumo de bebidas o alimentos que contenían xantina, café, té, cola, cacao o chocolate tampoco estaban permitidos. Al final de ambas etapas se realizaron pruebas de seguridad de laboratorio, exámenes físicos y revisión de posibles efectos adversos.

3.10.1.1. Fase 1: Estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después de la ingesta de una dosis única de aceitunas Arbequina en sujetos sanos

a) Sujetos de investigación

El estudio fue desarrollado en un grupo de 18 varones sanos seleccionados del panel de voluntarios del CIM-Sant Pau, los cuales recibieron dos diferentes dosis de aceitunas Arbequina de forma aleatoria; 60 y 120 aceitunas. El programa de aleatorización fue generado mediante el programa R de forma equilibrada, así, todos los participantes recibieron ambas intervenciones. La Figura 3.10 representa el procedimiento en el que los sujetos de investigación fueron asignados a los dos grupos de dosis.

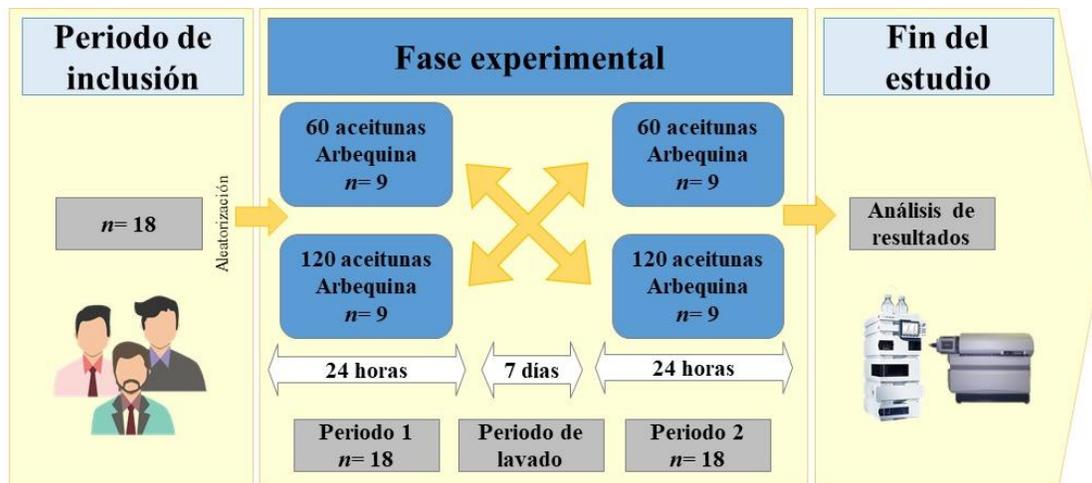


Figura 3.10. Diseño experimental del estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos derivados de las aceitunas en sujetos sanos.

b) Procedimiento experimental

El día anterior a la administración, los voluntarios tomaron su cena a las 21:00 horas siguiendo las recomendaciones de restringir alimentos ricos en triterpenos y bebidas o alimentos que contuvieran xantina, café, té, cola, cacao o chocolate. Posteriormente, se sometieron a un ayuno de 10 horas y a las 8:00 horas del día siguiente, los voluntarios asistieron al hospital para obtener la primera muestra de sangre de 10 ml para conocer las concentraciones basales de los triterpenos. A continuación, se administró una dosis única de aceitunas a cada sujeto con 240 ml de agua. Los voluntarios tuvieron 5 minutos para ingerir las 60 aceitunas y 10 minutos para consumir las 120 aceitunas. Además, las aceitunas y los huesos restantes fueron pesadas antes y después de su ingestión para mantener un registro de la cantidad de aceitunas deshuesadas que se han consumido. La ingestión de agua no fue permitida hasta 2 horas después de la administración de las aceitunas, siendo permitida *ad libitum* a partir de ese momento. El desayuno fue realizado 4 horas post-administración y el almuerzo y la cena fueron consumidos a las 6 y 10 horas después de la ingestión de las aceitunas, respectivamente.

Las muestras de sangre para determinar las concentraciones plasmáticas de triterpenos pentacíclicos fueron obtenidas desde una hora antes de la administración hasta 24 horas después de la dosificación (Figura 3.11). Para ello, se utilizaron tubos de 5 ml en S-Monovette que contenían EDTA K_2 . Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a $1900 \times g$ a $4^\circ C$. El plasma se aspiró con una pipeta Pasteur sin perturbar la capa superior de células y se distribuyó en 4 alícuotas de 1 ml en crioviales de 2 ml para su congelación y almacenamiento a $-80^\circ C$ hasta su análisis por LC-MS. Además, durante las 24 horas del experimento, la presión arterial y la frecuencia cardíaca de los sujetos se monitorearon

mediante un dispositivo digital automatizado en posición de decúbito supino. Por último, 12 horas después de terminar el ensayo, los sujetos regresaron a casa. Después del periodo de lavado de 7 días, los voluntarios regresaron al hospital para recibir la otra dosis de aceitunas y seguir el mismo procedimiento descrito anteriormente.

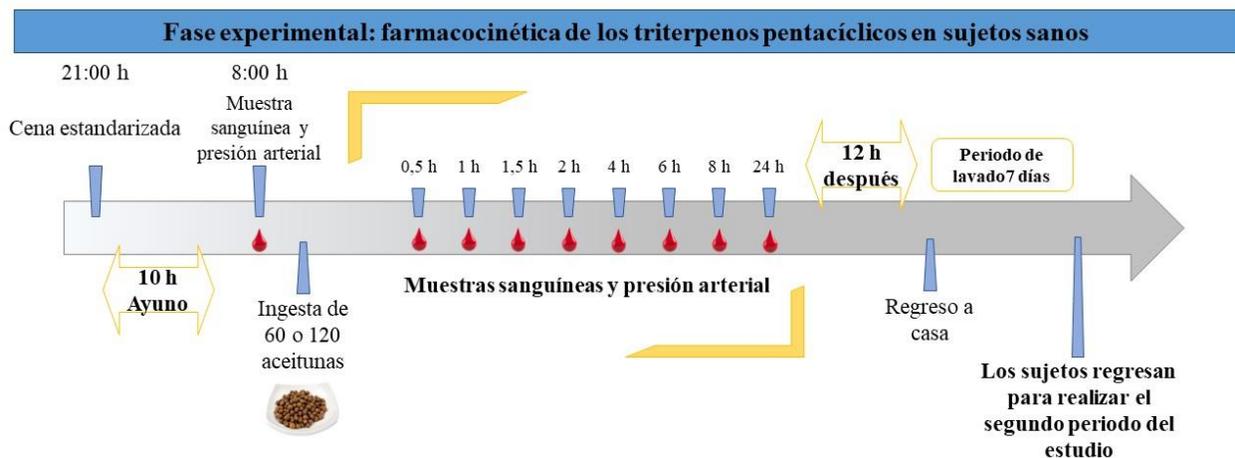


Figura 3.11. Fase experimental de la etapa 1: obtención de muestras sanguíneas para la determinación de los triterpenos pentacíclicos en plasma y medición de presión arterial en sujetos sanos.

3.10.1.2. Fase 2: intervención nutricional con aceitunas durante 30 días en sujetos sanos

a) Sujetos de investigación

El estudio fue desarrollado en un grupo de 40 sujetos de ambos sexos seleccionados del panel de voluntarios en el CIM-Sant Pau que cumplieron con los criterios de elegibilidad.

Los participantes fueron asignados a ambas intervenciones: aceituna arbequina o control de forma aleatoria y equilibrada (con igual número de sujetos en cada secuencia de intervención). Así, todos los participantes recibieron ambas intervenciones. La Figura 3.12 representa el procedimiento en el que los sujetos de investigación fueron asignados a los dos grupos de intervención.

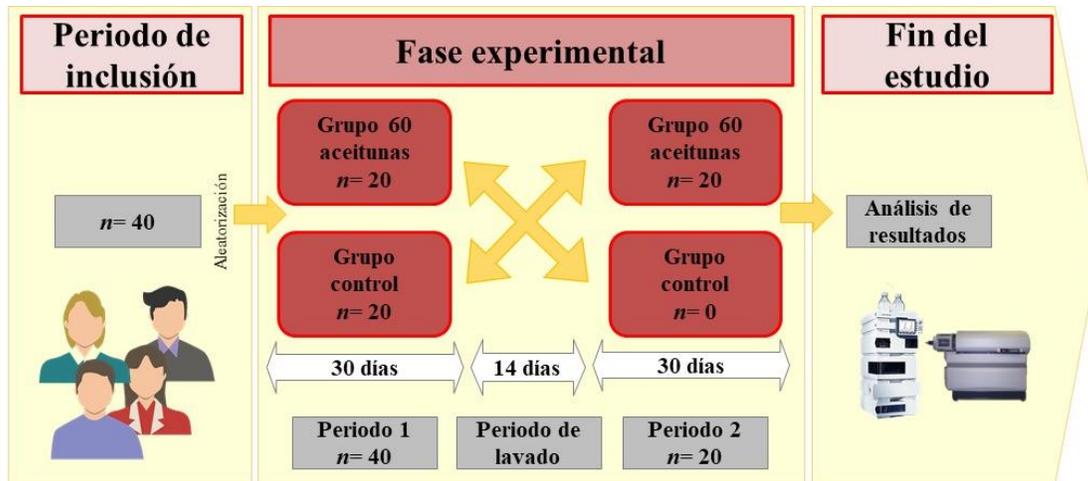


Figura 3.12. Diseño experimental del estudio de la intervención nutricional con aceitunas en sujetos sanos.

b) Procedimiento experimental

Los sujetos incluyeron la dosis de 60 aceitunas en su dieta habitual durante un periodo de 30 días. Después de la fase de inclusión, los sujetos asistieron al CIM-Sant Pau para recibir la cantidad de aceitunas correspondiente a los primeros 15 días de la intervención. Todos los participantes ingirieron el producto en el hogar sin modificar sus hábitos alimenticios, solamente siguiendo una dieta restrictiva en alimentos ricos en triterpenos, así como café, té negro, cola, cacao, chocolate y bebidas alcohólicas. Las aceitunas se consumieron dos veces al día: 30 aceitunas antes del almuerzo y 30 aceitunas antes de la cena. Los sujetos llevaron un registro del consumo de este alimento y un diario de sus hábitos alimentarios durante todo el estudio. Transcurridos los primeros 15 días, los sujetos volvieron para recibir la segunda parte de las aceitunas correspondiente a la dosis de los 15 días restantes y, finalmente, los participantes acudieron el día 30 para realizar la visita final. Los sujetos realizaron las dos sesiones experimentales de 30 días (grupo de intervención con 60 aceitunas y grupo control) con un período de lavado de 15 días entre ambos periodos, en el cual, los participantes evitaron el consumo de productos ricos en triterpenos. Las muestras de sangre fueron obtenidas antes de la intervención nutricional, 15 días después del consumo de aceitunas y el último día de cada sesión experimental, es decir a los 30 días de la ingesta de olivas (Figura 3.13).

El plasma fue procesado como se describe anteriormente en el estudio farmacocinético y se distribuyó en varios crioviales de 2 ml para su congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis por LC-MS. Además, se monitorizaron las variables de tolerabilidad, efectos adversos, peso corporal y presión

arterial sistólica y diastólica. La presión arterial se midió en posición decúbito supino mediante un dispositivo digital automatizado.

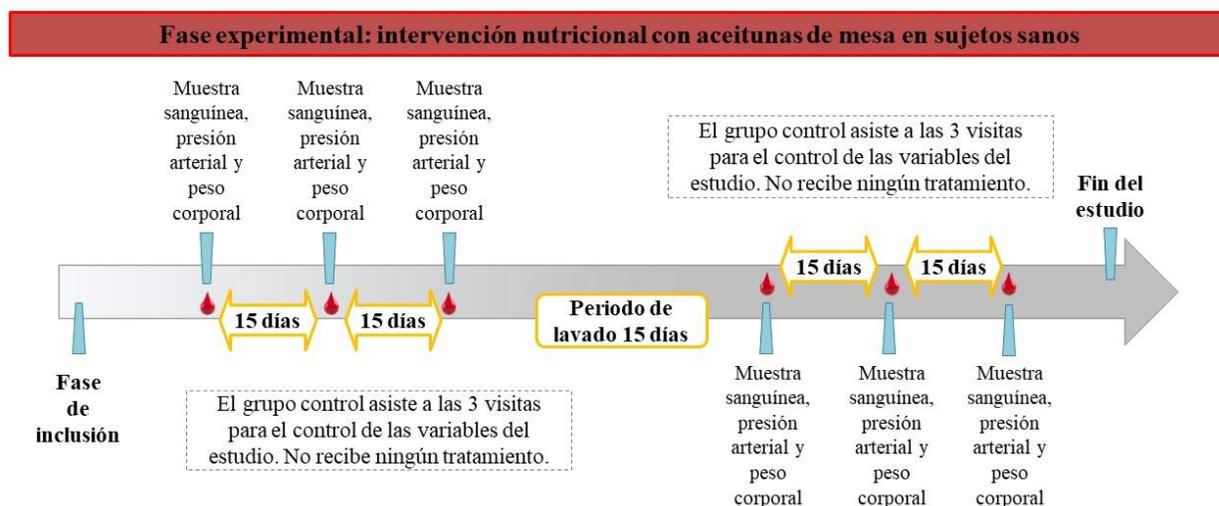


Figura 3.13. Fase experimental de la etapa 2: obtención de muestras sanguíneas para la determinación de los triterpenos pentacíclicos en plasma, medición de presión arterial y peso corporal en sujetos sanos.

3.10.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos por LC-MS

3.10.2.1. Extracción de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos

Se utilizó el proceso de extracción líquido-líquido descrito en el apartado 3.8.3.1 para el análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de rata. Debido a que es posible obtener una mayor cantidad de plasma en humanos, el método se ha modificado para utilizar 300 µl con la consiguiente adecuación de los volúmenes de todos los reactivos. Los 300 µl de plasma se colocaron en un tubo falcón de 15 ml y se adicionaron 15 µl de ácido ascórbico al 10% (recién preparado), 15 µl de ácido betulínico (2 µM), y 15 µl de ácido acético al 1%. La primera extracción se realizó con la incorporación de 3 ml de acetato de etilo a cada muestra. Después, las muestras se mezclaron en un vórtex durante 5 minutos, se colocaron en un baño de ultrasonidos (Fungilab) por 10 minutos y se centrifugaron a 3345xg durante 30 minutos a 2°C (Centrifuge Megafuge 1.0). Se recogió el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo falcón de 15 ml. El sedimento residual se sometió a una segunda extracción con 3 ml de acetato de etilo y el proceso se repitió en las mismas condiciones anteriormente descritas.

Los dos sobrenadantes se mezclaron y se le añadieron 15 µl de ácido ascórbico al 10% antes de la evaporación a sequedad a 45°C (Concentrador 5301, Eppendorf Ibérica S.L). El residuo se reconstituyó

Material y métodos

con 120 μl de metanol al 100%, se mezcló en vórtex durante 5 minutos y se añadieron 30 μl de agua Milli-Q. Después de la reconstitución del residuo la concentración de ácido betulínico fue de 0,2 μM . Posteriormente, las muestras se colocaron en un baño de ultrasonidos (Fungilab) durante 2 minutos y se centrifugaron a 3345xg durante 10 minutos a 2°C (Centrifuge Megafuge 1.0). Finalmente, las muestras se centrifugaron a 25000xg durante 30 minutos a 2°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG). Los sobrenadantes se colocaron en viales ámbar con inserto y se almacenaron a 4°C protegidos de la luz hasta el análisis por LC-MS (Figura 3.14).



Figura 3.14. Extracción de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos.

3.10.2.2. Análisis de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos

Para el análisis de los triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies) acoplado a un sistema QTRAP 4000 (AB Sciex) empleando las condiciones descritas en el apartado 3.6.3.1. La determinación de los metabolitos de los triterpenos pentacíclicos en el plasma de sujetos sanos se realizó siguiendo los siguientes parámetros de espectrometría descritos previamente en el apartado 3.8.3.2.

3.10.2.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de sujetos sanos

Las soluciones de trabajo se prepararon el mismo día del procesamiento de las muestras a las concentraciones de 0,05 a 10,0 μM para la etapa 1 del ensayo y a las concentraciones de 0,02 a 6,0 μM para la etapa 2. Estas contenían los 5 triterpenos pentacíclicos en metanol al 80% como disolvente de dilución. Posteriormente, se prepararon triplicados de cada punto de la curva de calibración a concentraciones finales de 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 y 500 nM para la etapa 1 del ensayo, es decir para la farmacocinética de los triterpenos, y a concentraciones de 0, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 300 nM para la etapa 2 del ensayo. El plasma blanco utilizado provino de un *pool* de todas las

muestras basales de todos los sujetos de investigación de cada etapa, es decir, antes de consumir las aceitunas.

La curva de calibración se sometió a dos extracciones líquido-líquido como se describe anteriormente en el apartado 3.10.2.1. Los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos se identificaron y cuantificaron como se describió previamente para las ratas SD, WKY y SHR en los apartados 3.8.3.2 y 3.9.6.2. Los resultados se expresaron en nM.

3.10.2.4. Validación del método de análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS

El método para la determinación de los triterpenos pentacíclicos en plasma ha sido previamente validado en ratas, como se describió en los apartados 3.8.3.4 y 3.9.6.5. No obstante, con el propósito de evaluar el estado del equipo en el momento de cada experimento, se evaluaron los siguientes parámetros: precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, selectividad y *carry over*, en un rango de concentración de 0 a 500 nM para la etapa 1 y de 0 a 300 nM para la etapa 2 de la intervención nutricional, todo ello en acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la EMA (2011). Los estándares de calibración se elaboraron por triplicado utilizando el *pool* de plasma procedente de las muestras basales.

3.10.3. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos derivados de aceitunas en sujetos sanos

Las concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos obtenidas a lo largo del tiempo después del consumo de una dosis única de aceitunas se analizaron siguiendo un enfoque no compartimental utilizando el software Phoenix 64 versión 8.1 (Cetara TM, Pharsight Corporation). Las concentraciones plasmáticas inferiores al LOQ no se consideraron para el análisis. Para cada dosis oral, los parámetros farmacocinéticos descritos anteriormente en el apartado 3.8.4 fueron calculados.

3.11. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SE). La recolección de los datos se realizó en hojas de cálculo de Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016). Posteriormente, la evaluación de los datos, el análisis estadístico y la elaboración de los gráficos se realizó en el programa Prism versión 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Para evaluar la normalidad de los datos en todos los experimentos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Material y métodos

En el estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos derivados de aceitunas en ratas SD, las diferencias en los valores plasmáticos de estos compuestos entre las dosis de 3,85 g o 7,70 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal fueron estimadas mediante un análisis de la varianza de 2 vías (ANOVA) seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni.

En el estudio del efecto del consumo de aceitunas en la presión arterial y el peso corporal de ratas WKY y SHR, las diferencias en los valores de presión arterial sistólica, diastólica y media, así como las diferencias en los valores de peso corporal, consumo de alimento, ingesta de agua y eficiencia de conversión alimenticia entre los grupos control y el de ingestión de aceitunas, se compararon mediante un ANOVA de 2 vías, seguido de la prueba *post hoc* LSD de Fisher. Por otra parte, las diferencias de los pesos húmedos de los órganos entre el grupo control y el grupo aceitunas fue evaluada mediante la prueba *t* de Student.

Finalmente, en la intervención nutricional, las diferencias presentadas en los valores plasmáticos de los triterpenos pentacíclicos entre las dosis de 60 y 120 aceitunas fueron estimadas mediante un ANOVA de 2 vías seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni. El mismo análisis estadístico fue utilizado para comparar los valores plasmáticos de los triterpenos pentacíclicos, el peso corporal y la presión arterial sistólica y diastólica en los voluntarios que consumieron 60 aceitunas durante 30 días y su grupo control.

En todos los estudios y en todas las pruebas se consideraron como estadísticamente significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

IV. RESULTADOS



4. Resultados

4.1. Capítulo I. Estudio de los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles en las aceitunas de la variedad Arbequina y en el pienso comercial para rata

4.1.1. Determinación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016

4.1.1.1. Validación del método utilizado para el análisis de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016

a). Precisión y exactitud

La precisión y la exactitud fueron determinadas por triplicado a cuatro niveles de concentración (0,5, 1, 1,5 y 2 μM). La precisión se calculó como el CV expresado en porcentaje de una sola secuencia de inyección en un día (intra-ensayo) y también en tres días diferentes (inter-ensayo). En este experimento, la precisión tuvo una variabilidad por debajo del 15% en todos los niveles de concentración (Tabla 4.1), cumpliendo con los requisitos establecidos por la EMA (2011).

Por otro lado, la exactitud, evaluada como la desviación porcentual de las concentraciones nominales contra las obtenidas en los dos días de ensayo, fue satisfactoria, mostrando una desviación porcentual menor al 15% (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 por LC-APCI-MS.

Compuesto	Precisión intra-ensayo (CV %)				Precisión inter-ensayo (CV %)				Exactitud (%)			
	0,5 μM	1 μM	1,5 μM	2 μM	0,5 μM	1 μM	1,5 μM	2 μM	0,5 μM	1 μM	1,5 μM	2 μM
Ácido maslínico	0,91	0,73	4,58	0,57	0,91	0,73	2,35	4,06	2,08	-1,06	0,68	1,64
Ácido oleanólico	1,69	0,31	1,75	1,31	1,69	1,48	0,89	1,12	0,06	1,74	-0,35	-0,68
Ácido ursólico	0,44	1,82	1,06	0,49	0,44	3,68	2,71	1,03	5,47	2,90	-0,54	-0,58
Eritrodiol	1,97	2,68	1,12	1,22	1,97	2,68	1,12	1,22	6,86	0,28	-1,58	0,81
Uvaol	1,65	1,90	1,48	0,23	1,65	3,99	1,58	2,25	5,53	2,79	-0,21	-0,76

CV, Coeficiente de variación. Los valores son presentados como media en el intra-ensayo ($n = 4$), inter-ensayo ($n = 2$) y exactitud ($n = 2$).

Resultados

b) Linealidad y sensibilidad

La linealidad del método fue evaluada comparando las regresiones lineales de las dos curvas de calibración obtenidas en dos experimentos diferentes en un rango de concentración de 0 a 2 μM . Los resultados obtenidos indicaron que el método fue lineal con R^2 mayores a 0,995 para todos los compuestos (Tabla 4.2).

La sensibilidad, evaluada mediante el LOD y el LOQ también en dos experimentos diferentes, indicó que el LOD para los triterpenos ácidos fue inferior a 2,79 nM, mientras que el LOD del eritrodiol y del uvaol fue de 18,1 nM y 98,6 nM, respectivamente. Con respecto al LOQ, se puede afirmar que para los triterpenos ácidos fue inferior a 4,65 nM y para el eritrodiol y el uvaol fue de 30,2 nM y 164,4 nM, respectivamente (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 por LC-APCI-MS.

Triterpeno pentacíclico	Linealidad		Sensibilidad	
	Ecuación	R^2	LOD (nM)	LOQ (nM)
Ácido maslínico	$y = (0,37753 \pm 0,04422)x - (3,655e^6 \pm 2,232e^5)$	0,998	2,41	4,02
Ácido oleanólico	$y = (0,40331 \pm 0,07678)x - (8,349e^6 \pm 1,849e^5)$	0,999	2,28	3,79
Ácido ursólico	$y = (0,31883 \pm 0,05568)x - (0,00725 \pm 0,01704)$	0,995	2,79	4,65
Eritrodiol	$y = (0,26981 \pm 0,02423)x - (0,00141 \pm 0,00199)$	0,998	18,1	30,2
Uvaol	$y = (0,08530 \pm 0,01327)x - (0,00217 \pm 0,00346)$	0,996	98,6	164,4

y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los triterpenos (μM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de las ecuaciones son expresados en media y desviación estándar de los dos días evaluados. Los resultados del R^2 , LOD y LOQ se representan como las medias de los dos días evaluados.

c). Carry over

El *carry over* fue evaluado inyectando secuencialmente el estándar de calibración de la concentración más alta seguido de muestras de metanol al 80%. Lo anterior se realizó en todas las secuencias de inyección. Como resultado, no se encontraron picos correspondientes a los analitos o al IS en las muestras de metanol inyectadas inmediatamente después a los estándares de calibración.

4.1.1.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2015-2016 por LC-MS

La identificación de cada triterpeno se llevó a cabo comparando el tiempo de retención obtenido para cada compuesto en los estándares de calibración en sus respectivos m/z , con el obtenido en las muestras

de aceitunas ($n = 4$). De esta manera, se identificó ácido maslínico, ácido oleanólico y eritrodiol en las muestras analizadas.

Los cromatogramas representativos de los tres triterpenos pentacíclicos identificados en las aceitunas Arbequina cosecha 2015-2016 y del IS, el ácido betulínico, pueden observarse en la figura 4.1. En las muestras examinadas no se detectó la presencia de ácido ursólico ni de uvaol.

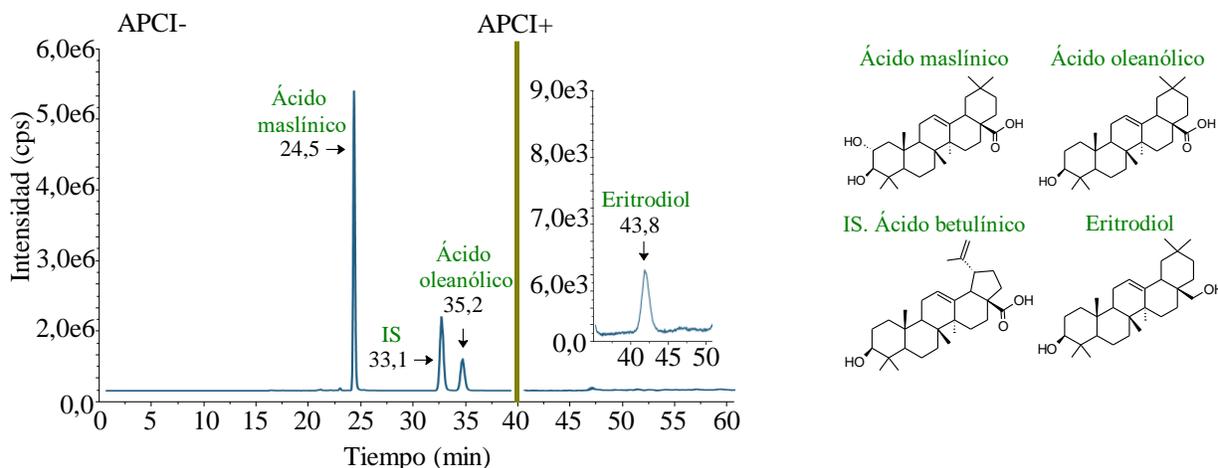


Figura 4.1. Cromatograma de iones totales (TIC) representativo de los triterpenos pentacíclicos encontrados en las aceitunas Arbequina cosecha 2015-2016 y obtenido por LC-APCI-MS. El eritrodiol se muestra como un cromatograma de iones extraídos (XIC).

4.1.1.3. Concentración de triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2015-2016

El análisis de los triterpenos pentacíclicos de las aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 mostró la presencia de tres triterpenos a una concentración total de 3945 mg/kg de aceitunas deshuesadas ($n = 4$). Los triterpenos pentacíclicos ácidos: maslínico y oleanólico fueron detectados en mayor cantidad con un porcentaje de 73% y 26%, respectivamente. Por otra parte, de los dos triterpenos alcoholes analizados, solo la cantidad de 1% de eritrodiol fue encontrada. La concentración de cada triterpeno se indica en la figura 4.2.

Esta cosecha de aceitunas Arbequina fue utilizada en el estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en ratas Sprague-Dawley.

Resultados

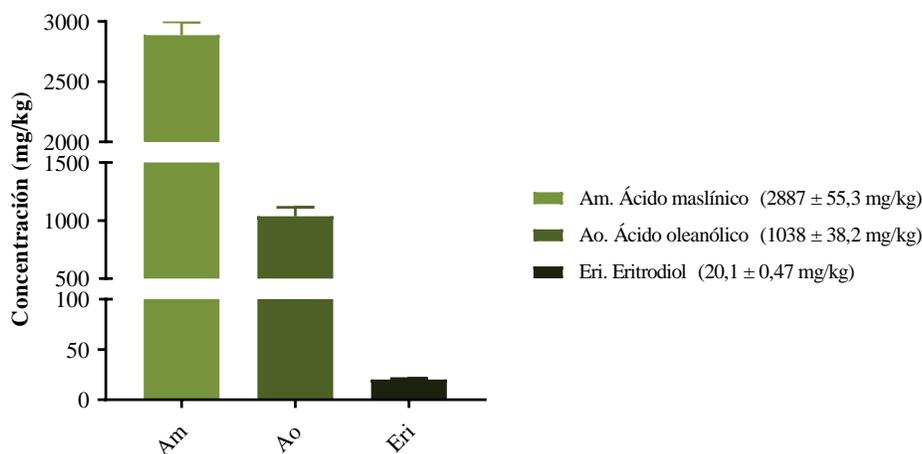


Figura 4.2. Concentración de triterpenos pentacíclicos por kg de aceitunas Arbequina deshuesadas de la cosecha 2015-2016. Los resultados fueron obtenidos por LC-APCI-MS. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media ($n = 4$).

4.1.2. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017

4.1.2.1. Validación del método utilizado para el análisis triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-MS

a) Triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017

Antes del análisis de los triterpenos en aceitunas de la cosecha 2016-2017, se estableció la precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método por cada nivel de concentración (0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 μM) que se analizó por triplicado (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-APCI-MS.

Triterpeno pentacíclico	Precisión CV (%)	Exactitud (%)	Linealidad		Sensibilidad	
			Ecuación	R^2	LOD (nM)	LOQ (nM)
Ácido maslínico	1,56	0,67	$y = 1,27042x - 1,510e^{-4}$	0,997	2,95	4,92
Ácido oleanólico	1,46	0,57	$y = 2,12548x + 1,527e^{-5}$	0,998	1,86	3,09
Ácido ursólico	5,06	0,42	$y = 1,96145x - 0,02482$	0,995	2,42	4,03
Eritrodiol	1,32	1,07	$y = 2145095x - 202803$	0,998	20,5	34,1
Uvaol	2,16	2,34	$y = 808199x - 67433,5$	0,996	101,8	169,7

CV, coeficiente de variación; y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los triterpenos (μM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de la precisión, exactitud y sensibilidad son expresados como las medias de todos los niveles de concentración evaluados.

Como resultado se obtuvo que la precisión intra-ensayo y la exactitud fueron apropiadas, mostrando un porcentaje de variabilidad por debajo del 15% en todos los compuestos (Tabla 4.3). Además, el R^2 de todos los triterpenos fue mayor a 0,995 presentando así las curvas de calibración una linealidad adecuada. En las condiciones cromatográficas utilizadas se presentaron valores de sensibilidad muy bajos para los triterpenos ácidos, ya que sus LOD oscilaron entre 1,86 nM y 2,95 nM; y consecuentemente sus LOQ estuvieron entre 3,09 nM y 4,92 nM. Por otra parte, para el eritrodio y el uvaol, se observaron valores de LOD de 20,5 nM y 101,8 nM y de LOQ de 34,1 nM y 169,7 nM, respectivamente (Tabla 4.3). No se observó *carry over*.

b) Polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017

Previo a la determinación de los polifenoles en aceitunas de la cosecha 2016-2017, se estableció la precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad tal como se muestra en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar polifenoles en aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017 por LC-ESI-MS/MS.

Polifenol	Precisión CV (%)	Exactitud (%)	Linealidad		Sensibilidad	
			Ecuación	R^2	LOD (nM)	LOQ (nM)
Apigenina	3,43	-0,20	$y = 464240x + 0,73414$	0,998	4,91	8,19
Ácido cafeico	2,56	-1,99	$y = 998800x + 0,98566$	0,998	2,07	3,46
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,12	-1,41	$y = 920143x + 18,6812$	0,998	3,42	5,69
Ácido vanílico	2,03	-2,95	$y = 62550,9x + 0,41702$	0,995	38,3	63,8
Catecol	4,20	-1,67	$y = 15867,5x + 0,0234$	0,997	24,5	40,8
Hidroxitirosol	2,86	-3,58	$y = 315914x + 27,4974$	0,997	1,74	2,90
Hidroxitirosol acetato	1,35	0,33	$y = 0,34106x - 4,435e^{-6}$	0,999	2,12	3,53
Luteolina	2,27	-0,33	$y = 580714x - 16454,7$	0,998	1,96	3,26
Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido	1,79	-0,80	$y = 1,08353x - 9,704e^{-8}$	0,999	2,74	4,57
Oleuropeína	2,78	-2,73	$y = 287013x - 0,7455$	0,996	1,21	2,01
(+)-Pinoresinol	4,56	-0,65	$y = 42322,6x - 0,0819$	0,997	53,8	89,6
Quercetina	2,36	0,12	$y = 0,58591x - 1,382e^{-5}$	0,999	3,55	5,92
Rutina	2,89	-1,77	$y = 268439x - 2,1821$	0,997	1,29	2,14
Salidroside	4,03	1,47	$y = 0,07270x - 8,366e^{-7}$	0,997	6,19	10,3
Tirosol	1,96	0,31	$y = 0,01024x - 2,183e^{-7}$	0,999	12,0	20,0
Verbascósido	2,52	0,57	$y = 228291x + 2,6128$	0,997	1,71	2,86

CV, coeficiente de variación; y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los polifenoles (μM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de la precisión, exactitud y sensibilidad son expresados como las medias de todos los niveles de concentración evaluados.

Resultados

La precisión intra-ensayo y exactitud fueron satisfactorias ya que el porcentaje de variabilidad estuvo por debajo del 15% recomendado (Tabla 4.4). También se pudo observar linealidad, ya que el R^2 de todos los polifenoles fue mayor a 0,995. Por último, 11 de los 16 polifenoles analizados en este experimento mostraron valores muy bajos de LOD que oscilaron entre 1,21 nM y 6,19 nM y consecuentemente sus valores de LOQ estuvieron entre 2,01 nM y 10,3 nM. Por otra parte, se observaron valores de LOD más altos para el tirosol, catecol, ácido vanílico y pinosresinol que fueron de 12,0 nM a 53,8 nM y consiguientemente valores más altos de LOQ que fueron de 20,0 nM a 89,6 nM. No se observó *carry over*.

4.1.2.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017 por LC-MS

a) Triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017

El tiempo de retención de cada compuesto obtenido en los estándares de calibración en sus respectivos m/z se comparó con el obtenido en las muestras de aceitunas ($n = 5$). De esta manera, se identificaron tres triterpenos pentacíclicos en las Arbequinas cosecha 2016-2017: ácido maslínico, ácido oleanólico y eritrodíol.

Los cromatogramas representativos de los triterpenos identificados en las aceitunas y del IS, el ácido betulínico, se muestran en la figura 4.3. En las muestras analizadas no se detectó la presencia de ácido ursólico ni de uvaol.

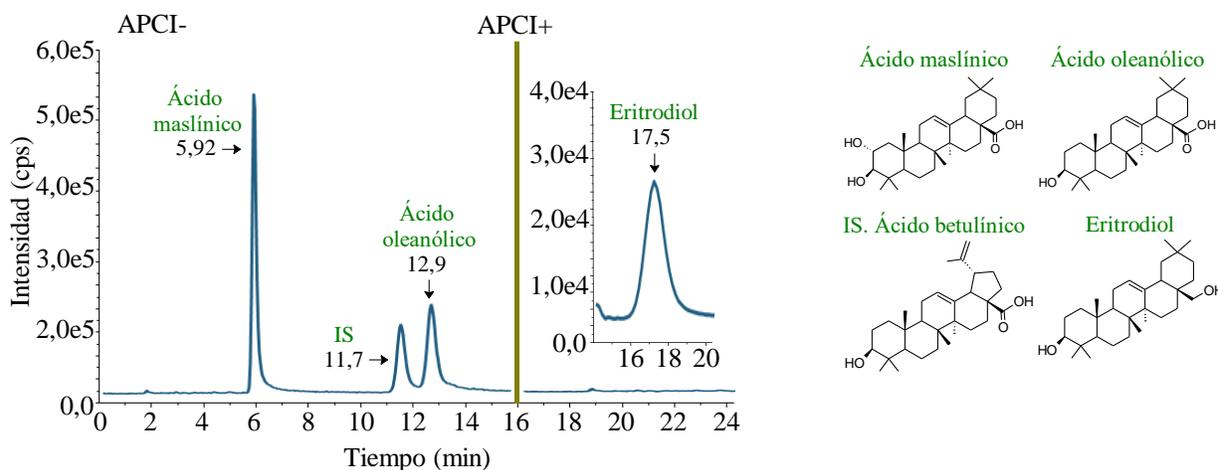


Figura 4.3. Cromatograma de iones totales (TIC) representativo de los triterpenos pentacíclicos encontrados en las aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017 y obtenido por LC-APCI-MS. El eritrodíol se muestra como un cromatograma de iones extraídos (XIC).

b) Polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017

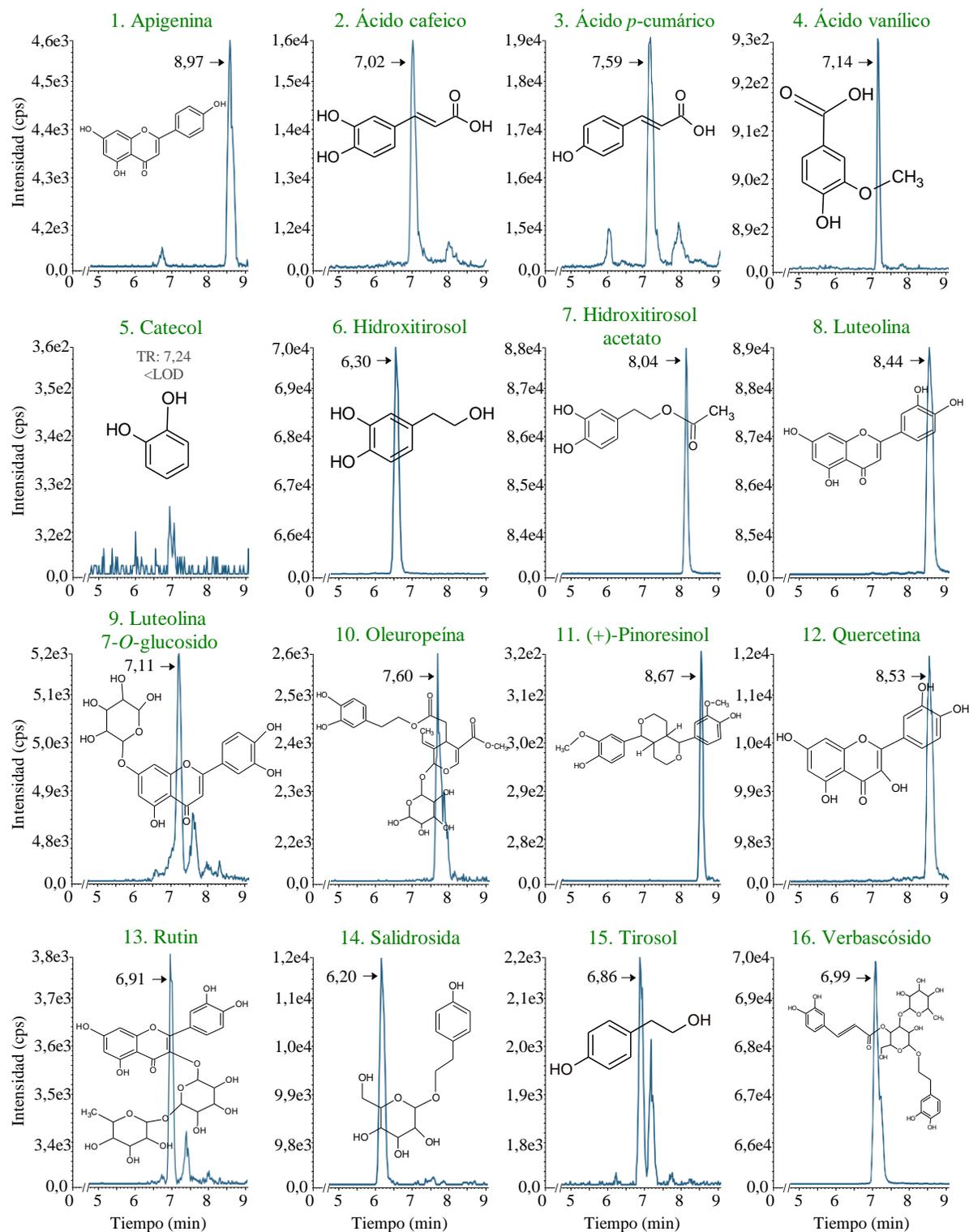


Figura 4.4. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) representativos de los polifenoles encontrados en las aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017 y obtenidos por LC-ESI-MS/MS. Tiempo de retención (TR), menor al límite de detección (<LOD).

Resultados

La identificación de los polifenoles se realizó comparando el tiempo de retención obtenido en los estándares de calibración para cada compuesto en sus respectivas transiciones m/z , con el obtenido en las muestras de aceitunas ($n = 5$). En la figura 4.4 se muestran los cromatogramas representativos de los 15 polifenoles identificados en las aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017. En las muestras analizadas no se detectó la presencia de catecol.

4.1.2.3. Concentración de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017

a). Triterpenos pentacíclicos en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017

El análisis de los triterpenos pentacíclicos de las aceitunas Arbequina de la cosecha 2016-2017, mostró la presencia de tres triterpenos a una concentración total de 3214 mg/kg de aceitunas deshuesadas ($n = 5$).

El ácido maslínico y el ácido oleanólico representaron el 73% y 27% de la totalidad de los triterpenos encontrados. Por otra parte, el eritrodíol representó menos del 1% de los triterpenos detectados en esta cosecha de Arbequinas (Figura 4.5).

La cosecha de aceitunas del 2016-2017 fue utilizada en el estudio del efecto del consumo de aceitunas en la presión arterial y el peso corporal de ratas WKY y SHR y en la intervención nutricional donde se evaluó la concentración plasmática de triterpenos pentacíclicos obtenidos después de la ingesta de aceitunas Arbequina y el efecto de este alimento en la presión arterial de sujetos sanos.

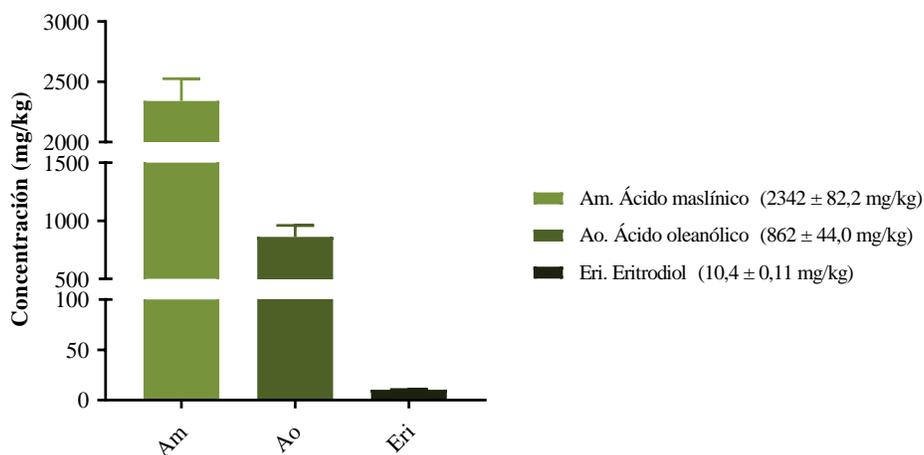


Figura 4.5. Concentración de triterpenos pentacíclicos por kg de aceitunas Arbequina deshuesadas de la cosecha 2016-2017. Los resultados fueron obtenidos por LC-APCI-MS. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media ($n = 5$).

b) Polifenoles en aceitunas Arbequina cosecha 2016-2017

Los resultados mostraron la presencia de 15 polifenoles de 5 clases diferentes como alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, secoiridoides y lignanos; todos ellos sumaron un total de 1043 mg/kg de aceitunas deshuesadas ($n = 5$). El hidroxitirosol representó el 45% de la totalidad de los polifenoles encontrados, seguido del verbascósido con 32% y de la luteolina con 9%; los 12 polifenoles restantes representaron el 14%. En la figura 4.6 se muestran las concentraciones de cada polifenol encontradas en las aceitunas cosecha 2016-2017. Esta cosecha, fue utilizada en el estudio del efecto del consumo de aceitunas en la presión arterial y el peso corporal de ratas WKY y SHR.

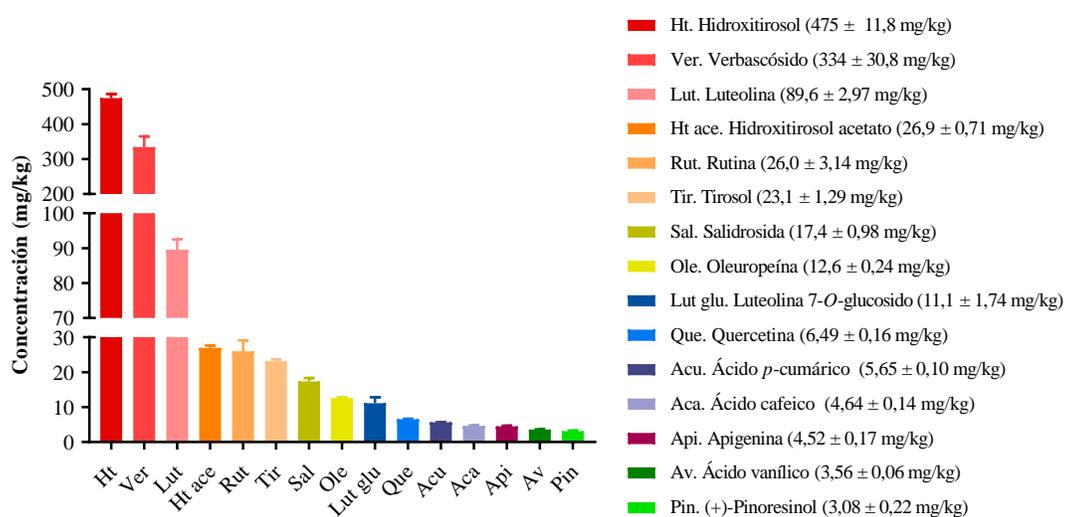


Figura 4.6. Concentración de polifenoles por kg de aceitunas Arbequina deshuesadas de la cosecha 2016-2017. Los resultados fueron obtenidos por LC-ESI-MS/MS. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media ($n = 5$).

4.1.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata

4.1.3.1. Validación del método utilizado en la determinación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata

a) Triterpenos pentacíclicos en el pienso comercial para rata

La precisión intra-ensayo, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar y cuantificar los triterpenos pentacíclicos en el pienso comercial para rata, se estimaron por triplicado por cada nivel de concentración (0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2 μ M). Los resultados se muestran en la tabla 4.5.

La precisión intra-ensayo y la repetitividad fueron adecuadas, ya que el porcentaje de variabilidad

Resultados

estuvo por debajo del límite de 15% recomendado. El R^2 de todos los triterpenos fue mayor a 0,996, mostrando linealidad.

Por último, los triterpenos se detectaron con suficiente sensibilidad, esto fue reflejado en los valores de LOD y LOQ menores a 3,23 nM y 5,38 nM presentado en los triterpenos ácidos. En relación con el eritrodiol y el uvaol, se observaron valores de LOD de 3,95 nM y 7,54 nM y de LOQ de 6,59 nM y 12,6 nM, respectivamente.

Tabla 4.5. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en el pienso comercial para rata por LC-APCI-MS.

Triterpeno pentacíclico	Precisión CV (%)	Exactitud (%)	Linealidad		Sensibilidad	
			Ecuación	R^2	LOD (nM)	LOQ (nM)
Ácido maslínico	2,75	-11,5	$y = 0,11802x - 0,00565$	0,996	8,28	13,8
Ácido oleanólico	2,37	-9,70	$y = 0,53126x + 0,05922$	0,997	2,04	3,40
Ácido ursólico	7,52	-5,92	$y = 0,47898x - 0,00348$	0,998	3,23	5,38
Eritrodiol	4,13	9,84	$y = 0,37780x + 0,00443$	0,996	3,95	6,59
Uvaol	11,1	8,08	$y = 0,10338x + 0,00275$	0,997	7,54	12,6

CV, coeficiente de variación; y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los triterpenos (μM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-senal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-senal 5:1). Los resultados de la precisión, exactitud y sensibilidad son expresados como las medias de todos los niveles de concentración evaluados.

b) Polifenoles en el pienso comercial para rata

La precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para identificar y cuantificar los polifenoles en el pienso comercial para rata se estimaron en dos muestras por cada nivel de concentración (0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 y 1, μM). Los resultados se muestran en la tabla 4.6.

Los resultados indicaron que la variabilidad de la precisión intra-ensayo y exactitud obtenidos para todos los polifenoles estudiados fueron inferiores al 15%. Además, el coeficiente de correlación de todos los polifenoles fue mayor a 0,993, con excepción del tirosol cuyo R^2 fue de 0,989.

Respecto a la sensibilidad de detección de todos los compuestos, el LOD fluctuó de 0,01 nM a 3,57 nM, mientras que el LOQ se situó de 0,02 nM a 5,95 nM.

Tabla 4.6. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar polifenoles en el pienso comercial para rata por LC-ESI-MS/MS.

Polifenol	Precisión CV (%)	Exactitud (%)	Linealidad		Sensibilidad	
			Ecuación	R ²	LOD (nM)	LOQ (nM)
Apigenina	3,44	-4,03	y = 415670x + 98,6744	0,999	0,12	0,20
Ácido cafeico	3,68	2,32	y = 1,614e ⁺⁶ x - 7049,41	0,998	0,45	0,75
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,00	0,06	y = 1,187e ⁺⁶ x + 12142,5	0,993	0,66	1,10
Ácido vanílico	3,10	5,01	y = 99183,5x - 36,4425	0,999	3,11	5,18
Catecol	9,73	-7,01	y = 22940,2x - 24,0435	0,995	1,06	1,77
Hidroxitirosol	5,06	-1,13	y = 350485x + 434,775	0,996	0,76	1,26
Hidroxitirosol acetato	4,58	2,26	y = 519752x + 3961,51	0,995	0,50	0,84
Luteolina	7,62	-2,16	y = 504205x + 841,999	0,997	0,05	0,09
Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido	5,80	-3,11	y = 1,785e ⁺⁶ x + 496,057	0,999	0,01	0,02
Oleuropeína	6,56	-2,88	y = 339088x - 78,4840	0,996	0,07	0,72
(+)-Pinoresinol	2,61	-5,72	y = 39181,6x + 77,3637	0,996	0,74	1,23
Quercetina	5,39	-4,94	y = 808837x - 279,830	0,998	0,12	0,20
Rutina	5,37	-4,90	y = 334893x - 112,665	0,997	0,05	0,09
Salidrosidea	12,1	-2,72	y = 110405x + 1772,01	0,993	1,14	1,90
Tirosol	12,5	-8,25	y = 18145,0x - 16,9122	0,989	3,57	5,95
Verbascósido	8,37	7,46	y = 441238x - 3814,34	0,996	0,53	0,89

CV, coeficiente de variación (CV); y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los polifenoles (μM); R², coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de la precisión, exactitud y sensibilidad son expresados como las medias de todos los niveles de concentración evaluados.

4.1.3.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata

a) Triterpenos pentacíclicos en el pienso comercial para rata

El análisis de los cromatogramas obtenidos después de la extracción del pienso de rata no reveló la presencia de ningún triterpeno pentacíclico, tal como se puede observar en la Figura 4.7. En dicha figura solo se muestra la presencia del pico correspondiente al ácido betulínico que actúa como IS.

Resultados

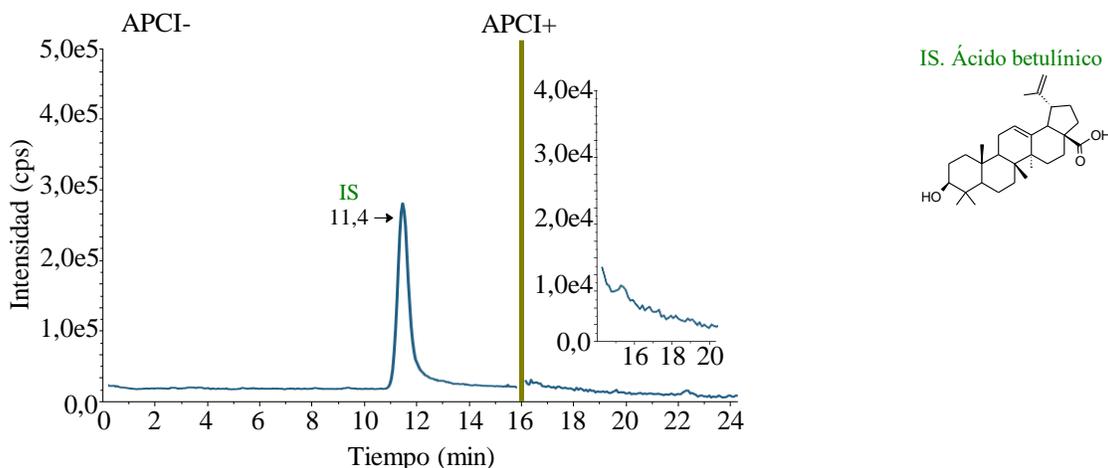


Figura 4.7. Cromatograma de iones totales (TIC) representativo de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el pienso comercial y obtenido por LC-APCI-MS. El eritrodinol se muestra como un cromatograma de iones extraídos (XIC).

b) Polifenoles en el pienso comercial para rata

La identificación de los polifenoles en el pienso comercial ($n = 2$) se realizó como se ha indicado anteriormente en las aceitunas. La mayoría de los polifenoles estuvieron ausentes en las muestras analizadas y solo pequeñas cantidades de ácido cafeico, ácido *p*-cumárico y ácido vanílico fueron detectados. En la figura 4.8 se muestran los cromatogramas representativos del análisis de los polifenoles en el pienso comercial por LC-ESI-MS/MS.

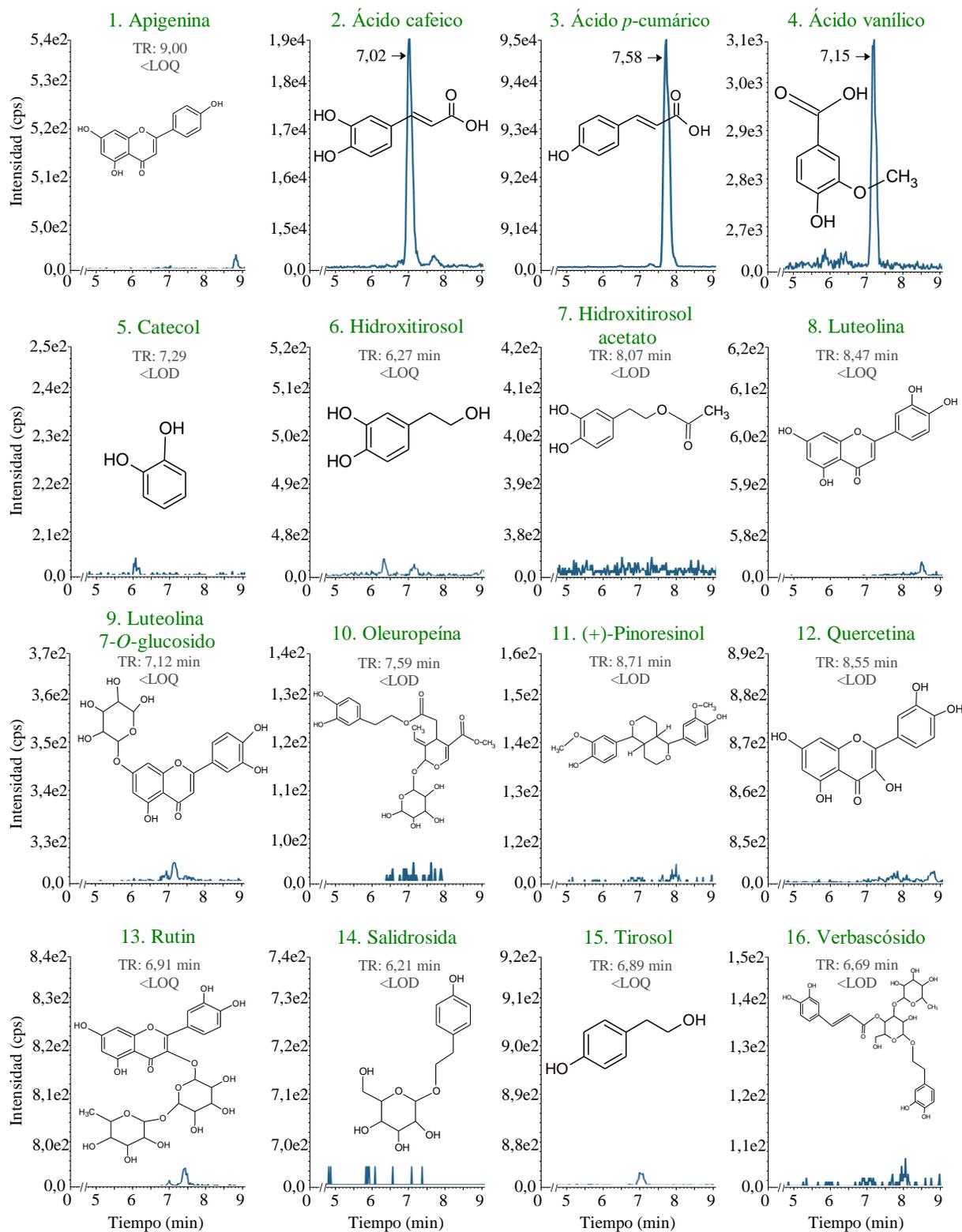


Figura 4.8. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) representativos de los polifenoles encontrados en el pienso comercial y obtenidos por LC-ESI-MS/MS. Tiempo de retención (TR), menor al límite de detección (<LOD), menor al límite de cuantificación (<LOQ).

Resultados

4.1.3.3. Concentración de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en el pienso comercial para rata

En las muestras analizadas de pienso comercial no se detectó la presencia de ningún triterpeno pentacíclico. Además, la mayoría de los polifenoles estuvieron ausentes. No obstante, se detectaron pequeñas cantidades de ácido cafeico ($0,26 \pm 0,001$ mg/kg), ácido *p*-cumárico ($1,72 \pm 0,004$ mg/kg) y ácido vanílico ($0,54 \pm 0,004$ mg/kg) ($n = 2$). La determinación de la concentración de los triterpenos y polifenoles en el pienso comercial se realizó con el objetivo de garantizar que las concentraciones plasmáticas de estos compuestos encontradas durante los experimentos realizados con los animales se debían al consumo de las aceitunas de la variedad Arbequina.

4.2. Capítulo II. Concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Arbequina

El estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos procedentes de la administración oral de aceitunas, se evaluó en ratas SD a las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal y como se mencionó previamente en material y métodos, estas dosis corresponden a un consumo en humanos de 30 y 60 aceitunas. Para ello, se utilizaron las aceitunas de la variedad Arbequina de la cosecha 2015-2016 cuyas concentraciones de triterpenos pentacíclicos se describen en el apartado 4.1.1.3. Las aceitunas se suministraron en forma de suspensión conforme al peso corporal de cada animal. Así, las ratas SD asignadas a la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg tuvieron un peso corporal de $276 \pm 4,86$ g ($n = 6$); mientras que las ratas destinadas a recibir la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg, tuvieron un peso corporal de $293 \pm 9,27$ g ($n = 7$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal de ambos grupos de animales cuando se aplicó una *t* de Student ($p < 0,05$). La dosis de ácido maslínico, ácido oleanólico y eritrodiol, así como la cantidad de estos triterpenos pentacíclicos administrados a los animales se muestran en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Dosis de triterpenos pentacíclicos administrados a las ratas Sprague-Dawley en el estudio farmacocinético.

Compuesto	Dosis de 3,85 g de aceitunas/kg			Dosis de 7,70 g de aceitunas/kg		
	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a	Cantidad administrada (μg) ^b	Cantidad administrada (nM) ^b	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a	Cantidad administrada (μg) ^b	Cantidad administrada (nM) ^b
Ácido maslínico	11116	$3066 \pm 54,1$	6486 ± 114	22233	6521 ± 206	13796 ± 436
Ácido oleanólico	3995	$1102 \pm 19,5$	$2413 \pm 42,6$	7990	$2344 \pm 74,0$	5132 ± 162
Eritrodiol	77,3	$21,3 \pm 0,38$	$48,2 \pm 0,85$	154	$45,4 \pm 1,43$	$102,4 \pm 3,23$

^a Dosis de triterpenos pentacíclicos en 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal. ^b Cantidad promedio de triterpenos pentacíclicos administrados a las ratas. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media.

4.2.1. Validación del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS

4.2.1.1. Efecto matriz y recuperación

En este experimento, el efecto matriz del IS, el ácido betulínico, fue de $102,5 \pm 2,5\%$ ($n = 6$), mientras que la recuperación fue de $70,6 \pm 2,9\%$ ($n = 6$). Además, se calculó el efecto matriz y la recuperación para cada analito y sus respectivas áreas ratio a las concentraciones de 25 nM y 100 nM. En la tabla 4.8 se puede observar que, el efecto matriz de los analitos y de sus áreas ratio estuvieron dentro del 80% y 120% recomendado. Por otra parte, la recuperación de todos analitos estuvo por debajo del 80%. No obstante, cuando se calcularon las áreas ratio, la recuperación fue satisfactoria, mostrando porcentajes

Resultados

que fueron desde 96,0% al 104,9% para las concentraciones de 25 nM y 100 nM. Las áreas ratio fueron utilizadas en el cálculo de las concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos.

Tabla 4.8. Efecto matriz y recuperación en la determinación de triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS.

Compuesto	Efecto matriz (%)				Recuperación (%)			
	Analito 25 nM	Área ratio 25 nM	Analito 100 nM	Área ratio 100 nM	Analito 25 nM	Área ratio 25 nM	Analito 100 nM	Área ratio 100 nM
Ácido maslínico	109,5 ± 2,9	104,3 ± 1,4	103,4 ± 7,0	103,2 ± 3,1	78,0 ± 5,0	104,9 ± 4,3	64,9 ± 3,4	97,2 ± 3,3
Ácido oleanólico	112,5 ± 3,8	107,0 ± 0,4	104,5 ± 2,8	104,6 ± 3,5	76,4 ± 2,7	103,2 ± 2,5	66,4 ± 3,7	99,0 ± 2,7
Ácido ursólico	107,5 ± 5,9	102,5 ± 4,4	101,4 ± 0,9	101,6 ± 3,9	71,0 ± 0,8	96,0 ± 3,4	65,3 ± 5,9	96,8 ± 2,8
Eritrodiol	107,7 ± 2,7	102,6 ± 2,9	108,4 ± 2,6	108,4 ± 1,8	71,7 ± 3,5	96,6 ± 3,1	66,5 ± 2,4	99,6 ± 4,6
Uvaol	108,9 ± 2,3	103,8 ± 3,6	97,3 ± 3,1	97,4 ± 4,1	77,6 ± 0,1	104,6 ± 2,6	64,1 ± 1,6	96,2 ± 7,3

Los valores se presentan como media ± error estándar de la media ($n = 3$).

4.2.1.2. Precisión y exactitud

La precisión se calculó en una sola secuencia de inyección (intra-ensayo) y también en dos experimentos diferentes (inter-ensayo). Tal como se puede observar en los resultados mostrados en la Tabla 4.9, la variabilidad de todas las concentraciones estuvo por debajo del 15%, cumpliendo con los requisitos establecidos por la EMA. Por otro lado, la exactitud fue satisfactoria, mostrando una desviación porcentual menor al 15% (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-APCI-MS.

Compuesto	Precisión intra-ensayo (CV %)					Precisión inter-ensayo (CV %)					Exactitud (%)				
	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM	150 nM	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM	150 nM	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM	150 nM
Ácido maslínico	7,18	7,16	6,10	5,84	4,66	5,25	4,07	3,78	5,39	4,12	1,43	-1,02	-1,17	0,35	-0,13
Ácido oleanólico	7,26	4,17	5,27	4,65	3,82	8,78	7,54	3,93	4,33	2,46	-0,22	3,55	-7,65	2,42	-0,40
Ácido ursólico	5,65	6,16	6,66	4,98	4,18	5,66	8,48	5,42	5,04	2,97	-0,35	4,02	-5,56	0,68	0,29
Eritrodiol	4,23	5,38	10,1	2,06	2,72	5,44	5,37	5,78	3,19	1,56	2,60	3,87	-0,22	0,64	-0,37
Uvaol	4,11	4,71	2,09	1,08	1,45	5,50	5,22	1,08	1,87	1,66	3,09	3,07	0,24	0,90	0,37

CV, Coeficiente de variación. Los valores son presentados como media en el intra-ensayo ($n = 6$), inter-ensayo ($n = 2$) y exactitud ($n = 2$).

4.2.1.3. Linealidad y sensibilidad

La linealidad del método fue evaluada comparando las regresiones lineales de las dos curvas de calibración obtenidas en dos días diferentes en un rango de concentración de 0 a 150 nM. Los coeficientes de correlación fueron mayores a 0,996 para todos los compuestos (Tabla 4.10). La sensibilidad, evaluada también en dos experimentos diferentes, demostró que el LOD del ácido maslínico, oleanólico y ursólico fue inferior a 0,38 nM, mientras que el LOD del eritrodiol y del uvaol fue de 1,14 nM y 3,53 nM, respectivamente. Respecto al LOQ, los valores presentados por los triterpenos ácidos fueron menores a 0,63 nM, mientras que para el eritrodiol y el uvaol fueron de 1,90 nM y 5,87 nM, respectivamente (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-APCI-MS.

Triterpeno pentacíclico	Linealidad		Sensibilidad	
	Ecuación	R ²	LOD (nM)	LOQ (nM)
Ácido maslínico	$y = (0,00758 \pm 0,00028)x - (3,907e^7 \pm 2,266e^7)$	0,996	0,11	0,18
Ácido oleanólico	$y = (0,00982 \pm 0,00208)x - (1,160e^6 \pm 2,885e^6)$	0,996	0,17	0,28
Ácido ursólico	$y = (0,00757 \pm 0,00209)x + (0,00659 \pm 0,00850)$	0,996	0,38	0,63
Eritrodiol	$y = (0,00577 \pm 0,00049)x - (0,00403 \pm 0,00082)$	0,998	1,14	1,90
Uvaol	$y = (0,00214 \pm 0,00080)x - (0,00141 \pm 0,00779)$	0,997	3,53	5,87

y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los triterpenos (nM); R², coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de las ecuaciones son expresados en media y desviación estándar de los dos días evaluados. Los resultados del R², LOD y LOQ se representan como las medias de los dos días evaluados.

4.2.1.4. Selectividad

Las muestras de plasma blanco de rata que no contenían ni los triterpenos pentacíclicos ni el IS se compararon con las muestras fortificadas con los analitos a la concentración de 150 nM. De esta manera, se demostró que el procedimiento de extracción de los triterpenos pentacíclicos fue conveniente para diferenciar estos analitos de los compuestos endógenos encontrados en el plasma de los animales (Figura 4.9).

Resultados

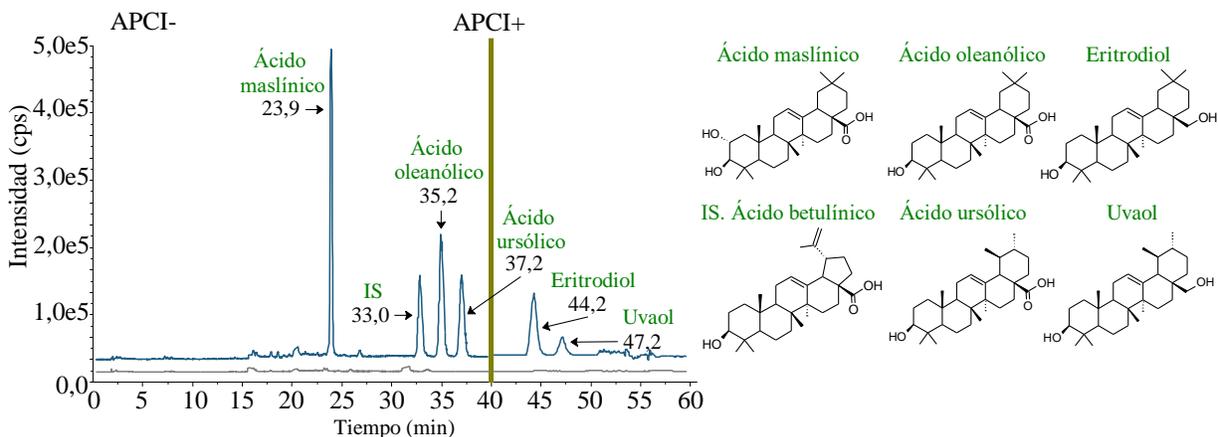


Figura 4.9. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido por LC-APCI-MS de plasma blanco de rata (línea gris) y plasma de rata enriquecido con una mezcla de triterpenos pentacíclicos a 150 nM (línea azul).

4.2.1.5. Carry over

El *carry over* fue evaluado inyectando secuencialmente el estándar de calibración de la concentración más alta seguido de un plasma blanco de rata. Lo anterior se realizó en los dos experimentos realizados y durante toda la secuencia de inyección. Como resultado, no se encontraron picos correspondientes a los analitos o al IS en las muestras de plasma blanco de los animales analizados inmediatamente después a los estándares de calibración.

4.2.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas Sprague-Dawley por LC-MS

4.2.2.1. Triterpenos pentacíclicos

El ácido maslínico y el ácido oleanólico fueron identificados en el plasma de los animales después de la administración de las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. Por otra parte, no se detectó la presencia de ácido ursólico, eritrodiol o uvaol en ningún tiempo analizado en ambas dosis de aceitunas.

Los cromatogramas representativos de los triterpenos pentacíclicos identificados en el plasma de los animales 1 hora después de la administración de las Arbequinas, pueden observarse en la figura 4.10.

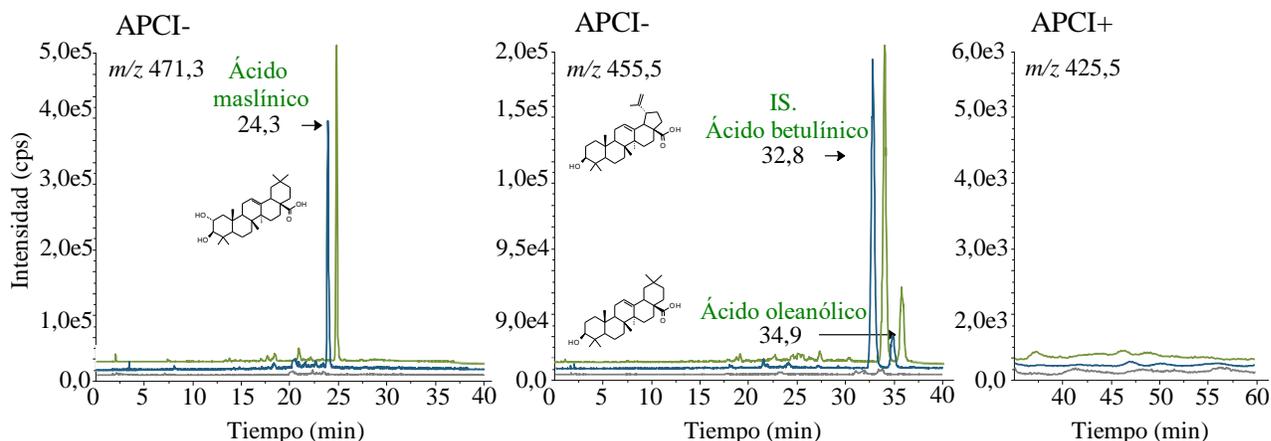


Figura 4.10. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el plasma de las ratas Sprague-Dawley 1 hora después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul) y 7,70 g (línea verde) de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal. La línea gris indica el XIC en el plasma blanco.

4.2.2.2. Metabolitos del ácido maslínico

A partir de la identificación del ácido maslínico en el plasma de ratas SD en ambas dosis de aceitunas, se buscaron metabolitos de fase I y II de este compuesto siguiendo sus masas moleculares a través de una aproximación de metabolómica dirigida. Además, se comprobó la presencia de los metabolitos comparando sus XIC con los presentados en el plasma de rata blanco, ya que dichos compuestos no tenían que estar presentes en los plasmas procedentes de ratas que no habían sido administrados con aceitunas.

En total, el ácido maslínico presentó 9 metabolitos: 4 metabolitos resultantes de la adición de un grupo hidroxilo (MMA1a-d), con la excepción de que a la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg no se detectó el metabolito MMA1d; 1 metabolito con adición de un grupo hidroxilo más la pérdida de un hidrogeno solamente en la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg (MMA2); 2 metabolitos con adición de dos grupos hidroxilo (MMA3a-b); 1 metabolito con adición de dos grupos hidroxilo y pérdida de dos hidrógenos (MMA4) y 1 metabolito con adición de un grupo hidroxilo que perdió dos hidrógenos y que se le añadió un ácido glucurónico (MMA5). Debido a la ausencia de los estándares de estos compuestos, no es posible conocer la posición exacta de estos grupos funcionales en la molécula del ácido maslínico.

Los cromatogramas representativos de los metabolitos del ácido maslínico después de la administración oral de las aceitunas pueden observarse en la figura 4.11.

Resultados

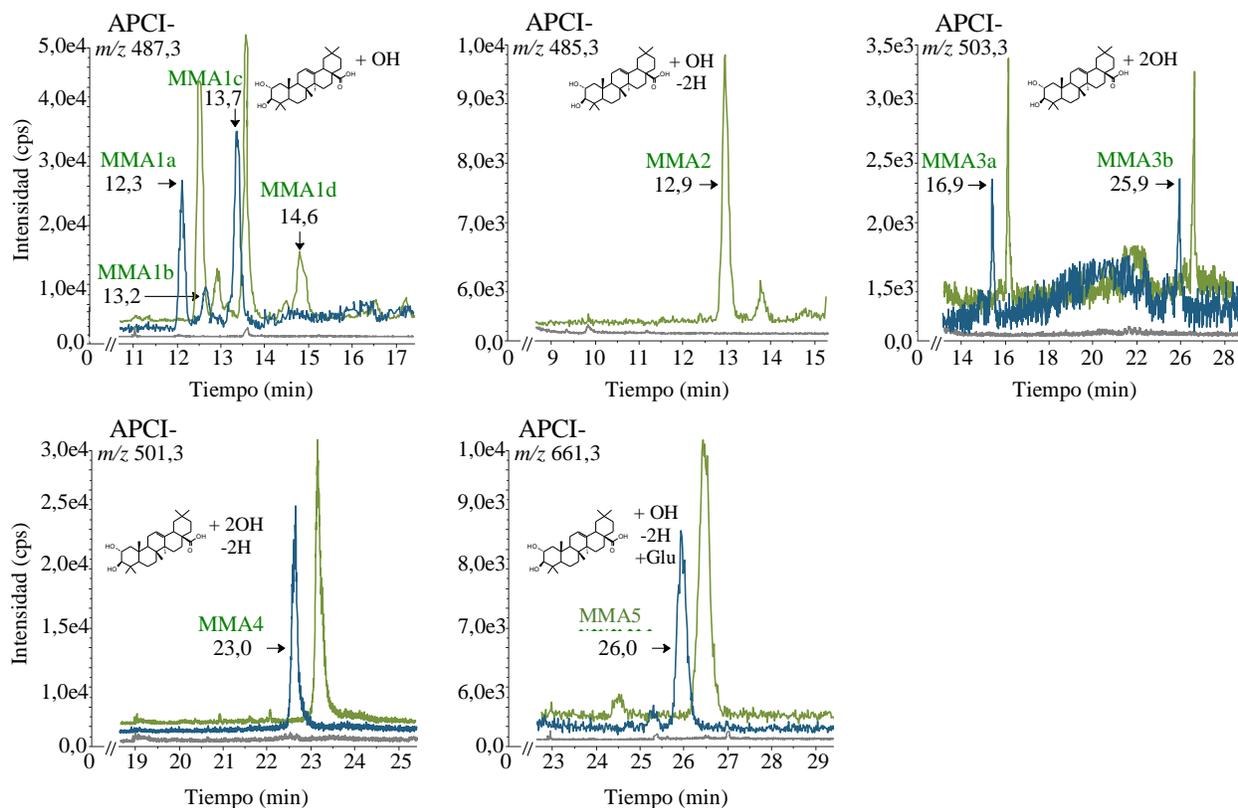


Figura 4.11. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-APCI-MS de los metabolitos del ácido maslínico encontrados en el plasma de las ratas Sprague-Dawley 1 hora después de la administración de las aceitunas. El XIC del metabolito MMA2 corresponde a las 6 horas después de la ingestión de aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul) y 7,70 g (línea verde) de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal. La línea gris indica el XIC en el plasma blanco.

4.2.2.3. Metabolitos del ácido oleanólico

Los metabolitos de fase I y II del ácido oleanólico se examinaron en ambas dosis de aceitunas según sus masas moleculares y comparando sus XIC con los presentados en el plasma de rata blanco, en el que dichos compuestos tenían que estar ausentes.

El ácido oleanólico presentó 5 metabolitos: 3 metabolitos con adición de un grupo hidroxilo (MOA1a-c), con la excepción de que a la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg no se detectó el metabolito MOA1a y 2 metabolitos con adición de un grupo sulfato (MOA2a-b). Debido a la ausencia de los estándares de estos metabolitos, no es posible conocer la posición exacta de estos grupos funcionales en la molécula del ácido oleanólico. Los cromatogramas representativos de los metabolitos del ácido oleanólico después de la administración oral de las aceitunas pueden observarse en la figura 4.12.

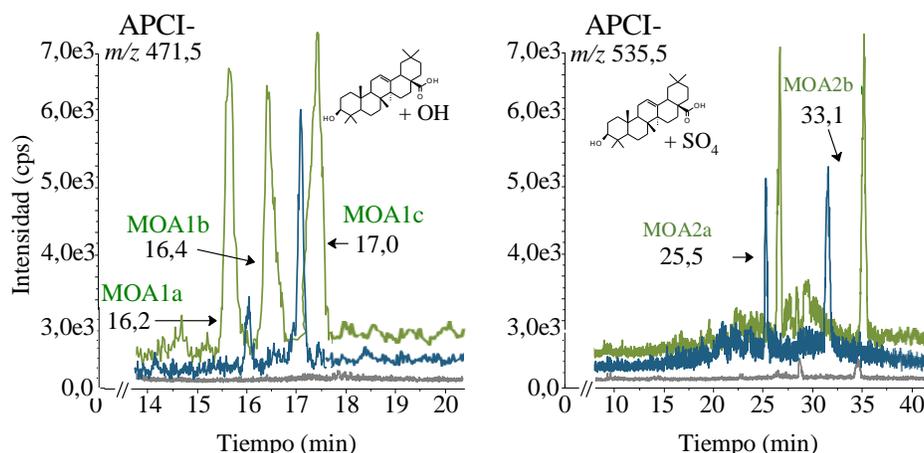


Figura 4.12. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-APCI-MS de los metabolitos del ácido oleánico encontrados en el plasma de las ratas Sprague-Dawley 1 hora después de la administración de las dosis de 3,85 g (línea azul) y 7,70 g (línea verde) de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal. La línea gris indica el XIC en el plasma blanco.

4.2.3. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después de la administración oral de aceitunas en ratas Sprague-Dawley

4.2.3.1. Ácido maslínico y sus metabolitos

a) Ácido maslínico

En la figura 4.13 se puede observar que el ácido maslínico estuvo presente en el sistema circulatorio durante las 8 horas del estudio en ambas dosis: 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal, siendo estadísticamente superiores las concentraciones plasmáticas producidas por la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con las aportadas por los 3,85 g de aceitunas/kg ($p < 0,05$).

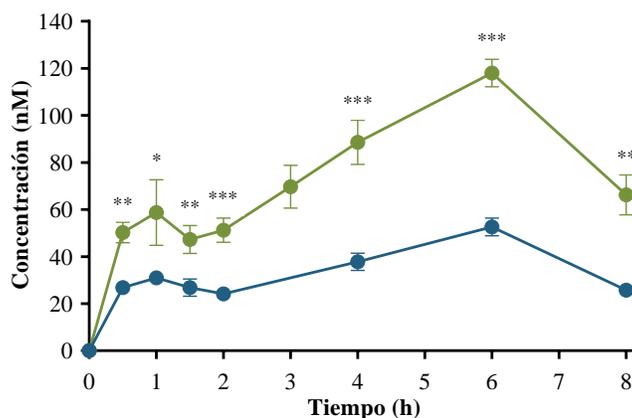


Figura 4.13. Concentraciones de ácido maslínico encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Resultados

Tabla 4.11. Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	<i>p</i> [*]
Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico (nM)			
0,5 h	26,8 ± 1,67	50,2 ± 4,39	0,009
1 h	31,0 ± 2,09	58,8 ± 14,0	0,041
1,5 h	26,8 ± 3,68	47,3 ± 5,99	0,018
2 h	24,2 ± 2,58	51,2 ± 5,18	0,001
3 h	-- ^a	69,8 ± 9,11	--
4 h	37,8 ± 3,69	88,6 ± 9,42	0,001
6 h	52,6 ± 3,74	118 ± 5,88	0,001
8 h	25,8 ± 2,14	66,3 ± 8,56	0,010
Parámetros farmacocinéticos del ácido maslínico			
T _{max} (h)	6,03 ± 0,02	6,09 ± 0,42	0,910
C _{max} (nM)	52,6 ± 3,74	111 ± 9,92	0,001
AUC _{extrap} (%)	19,0 ± 2,65	41,0 ± 18,0	0,294
AUC _{0-∞} (nM·h)	357 ± 27,5	1336 ± 395	0,069
AUC _{last} (nM·h)	237 ± 25,8	484 ± 67,2	0,008
λ _z (1/h)	0,39 ± 0,04	0,24 ± 0,10	0,249
t _{1/2} (h)	1,82 ± 0,20	5,05 ± 2,88	0,326
MTR _{0-∞} (h)	5,76 ± 0,25	9,91 ± 3,77	0,334
MTR _{last} (h)	4,09 ± 0,23	4,13 ± 0,15	0,880

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de las dosis 3,85 g (*n* = 6) y 7,70 g (*n* = 7) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante *t* de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

En el estudio farmacocinético se encontró que las concentraciones plasmáticas de ácido maslínico aumentaron hasta alcanzar su T_{max} a las 6 horas del experimento. Así, después de 6 horas de la administración de 3,85 g de aceitunas/kg, la C_{max} del ácido maslínico fue de 52,6 ± 3,74 nM. En el mismo tiempo, la ingestión de 7,70 g de aceitunas/kg duplicó la C_{max} de este triterpeno a 111 ± 9,92 nM. Por otra parte, el AUC_{extrap} de la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg fue mayor al 20%, esto indica que las fracciones extrapolables al infinito de los parámetros farmacocinéticos necesitan valores plasmáticos obtenidos a tiempos más largos para poder caracterizar de forma más adecuada la fase de eliminación y poder obtener una estimación más precisa. Por ello, los parámetros a considerar para el análisis farmacocinético no compartimental del ácido maslínico y de sus metabolitos fueron los estimados hasta la última concentración reportada (Tabla 4.11). Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el ácido maslínico comprendió el 58% y el 60% para

las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg.

b) Metabolito monohidroxilado MMA1a

Este metabolito fue detectado en plasma durante las 8 horas del estudio en ambas dosis: 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. No obstante, y como se puede apreciar en la figura 4.14 y en la tabla 4.12, las concentraciones plasmáticas del metabolito MMA1a no fueron estadísticamente diferentes cuando se compararon ambas dosis de aceitunas ($p < 0,05$).

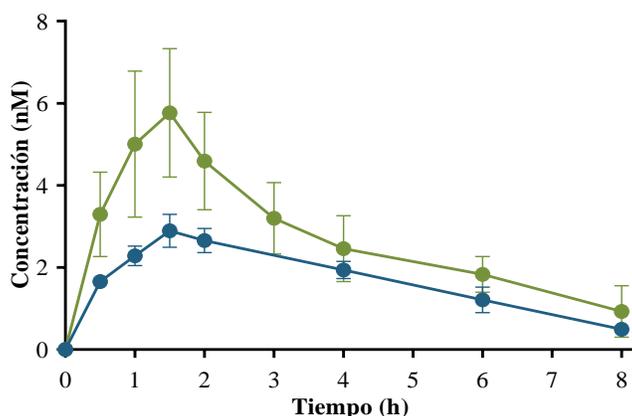


Figura 4.14. Concentraciones de MMA1a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos.

En relación con la farmacocinética de este metabolito, sus concentraciones en plasma incrementaron desde las 0,5 horas hasta alcanzar su T_{max} a las 1,78 horas y a las 1,73 horas posteriores a la ingestión de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg, respectivamente. La C_{max} resultante del consumo de la dosis más alta de aceitunas no fue suficiente para duplicar a la C_{max} obtenida por el consumo de la dosis más pequeña de Arbequinas. Al finalizar el estudio y después de 8 horas de la administración intragástrica de las aceitunas, las concentraciones plasmáticas de este metabolito fueron inferiores al 1 nM en ambas dosis de aceitunas (Tabla 4.12).

Los parámetros farmacocinéticos del metabolito MMA1a no fueron estadísticamente diferentes después del consumo de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal. Por otra parte, el AUC_{extrap} de ambas dosis fue menor al 20%, lo cual indicaría que las fracciones extrapolables al infinito, es decir, el $AUC_{0-\infty}$ y el $MTR_{0-\infty}$ fueron suficientemente precisas. No obstante, este es el único compuesto que presentó una AUC_{extrap} menor al 20% para ambas dosis de Arbequinas. Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el MMA1a representó el 3% en ambas dosis de aceitunas.

Resultados

Tabla 4.12. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxilado MMA1a y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	<i>p</i> [*]
Concentraciones plasmáticas de MMA1a (nM)			
0,5 h	1,65 ± 0,14	3,29 ± 1,03	0,187
1 h	2,28 ± 0,23	5,00 ± 1,78	0,128
1,5 h	2,89 ± 0,40	5,77 ± 1,56	0,126
2 h	2,65 ± 0,30	4,59 ± 1,19	0,144
3 h	-- ^a	3,20 ± 0,87	--
4 h	1,94 ± 0,21	2,46 ± 0,81	0,571
6 h	1,21 ± 0,32	1,83 ± 0,43	0,282
8 h	0,50 ± 0,12	0,93 ± 0,63	0,534
Parámetros farmacocinéticos del MMA1a			
T _{max} (h)	1,78 ± 0,10	1,73 ± 0,27	0,864
C _{max} (nM)	3,31 ± 0,35	5,94 ± 1,51	0,145
AUC _{extrap} (%)	14,6 ± 1,81	16,1 ± 2,73	0,665
AUC _{0-∞} (nM·h)	15,0 ± 1,60	24,6 ± 6,51	0,208
AUC _{last} (nM·h)	12,8 ± 1,36	20,5 ± 5,45	0,230
λ _z (1/h)	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,08	0,648
t _{1/2} (h)	2,20 ± 0,17	2,21 ± 0,26	0,967
MTR _{0-∞} (h)	4,15 ± 0,21	4,01 ± 0,23	0,663
MTR _{last} (h)	3,14 ± 0,19	2,83 ± 0,11	0,171

^aNo se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de las dosis 3,85 g (*n* = 6) y 7,70 g (*n* = 7) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante *t* de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

c) Metabolito monohidroxilado MMA1b

Las concentraciones en plasma de MMA1b producidas por la administración de 7,70 g de aceitunas/kg (*n* = 7) fueron estadísticamente superiores a las producidas por la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg (*n* = 6) desde las 0,5 horas hasta las 4 horas del experimento (*p* < 0,05). A las 6 horas del estudio, el MMA1b estuvo presente en el plasma de todos los animales y posteriormente, a las 8 horas, solo se detectaron pequeñas concentraciones de MMA1b en una rata de cada grupo (Figura 4.15).

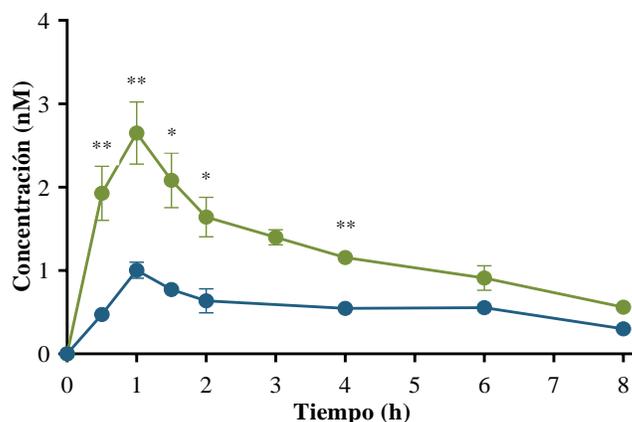


Figura 4.15. Concentraciones de MMA1b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabla 4.13. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado MMA1b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	p^*
Concentraciones plasmáticas de MMA1b (nM)			
0,5 h	0,47 \pm 0,07	1,92 \pm 0,33	0,005
1 h	1,00 \pm 0,10	2,65 \pm 0,37	0,005
1,5 h	0,78 \pm 0,04	2,08 \pm 0,33	0,024
2 h	0,64 \pm 0,14	1,64 \pm 0,24	0,011
3 h	-- ^a	1,40 \pm 0,09	--
4 h	0,54 \pm 0,02	1,16 \pm 0,08	0,010
6 h	0,55 \pm 0,03	0,91 \pm 0,14	0,078
8 h	0,30	0,56	--
Parámetros farmacocinéticos del MMA1b			
T_{max} (h)	1,02 \pm 0,14	1,28 \pm 0,11	0,174
C_{max} (nM)	0,88 \pm 0,11	2,26 \pm 0,37	0,005
AUC_{extrap} (%)	55,6 \pm 9,00	29,9 \pm 10,8	0,106
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	9,33 \pm 2,92	11,7 \pm 0,61	0,538
AUC_{last} (nM·h)	2,96 \pm 0,37	5,87 \pm 1,75	0,135
λ_z (1/h)	0,27 \pm 0,16	0,25 \pm 0,04	0,930
$t_{1/2}$ (h)	8,73 \pm 2,94	2,93 \pm 0,43	0,155
$MTR_{0-\infty}$ (h)	13,1 \pm 4,18	4,77 \pm 0,62	0,150
MTR_{last} (h)	2,71 \pm 0,37	2,22 \pm 0,27	0,318

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de las dosis 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

Resultados

Respecto a la farmacocinética, la C_{\max} producida por la ingestión de 3,85 g de aceitunas/kg fue de $0,88 \pm 0,11$ nM, mientras que la C_{\max} producida por el consumo de 7,70 g de aceitunas/kg fue dos veces mayor con $2,26 \pm 0,37$ nM. En ambas dosis la T_{\max} fue alcanzada antes de las 1,5 horas del experimento. Por último, el MMA1b representó escasamente el 1% del AUC_{last} total en ambas dosis de aceitunas (Tabla 4.13).

d) Metabolito monohidroxilado MMA1c

El MMA1c fue el metabolito mayoritario de todos los monohidroxilados del ácido maslínico en ambas dosis de Arbequinas: 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Fue detectado en plasma durante las 8 horas del estudio y como puede observarse en la figura 4.16 y en la tabla 4.14, las concentraciones plasmáticas de MMA1c aportadas por la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg fueron estadísticamente superiores a las producidas por la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($p < 0,05$).

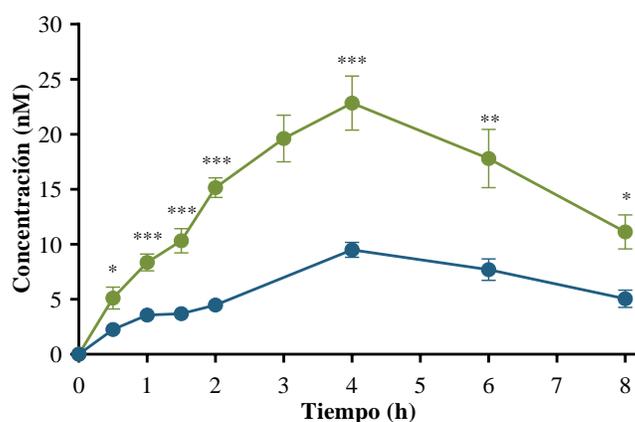


Figura 4.16. Concentraciones de MMA1c encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En relación con la farmacocinética de este metabolito, sus concentraciones en plasma incrementaron desde las 0,5 horas hasta alcanzar su T_{\max} a las 4,50 horas y a las 4,91 horas posteriores a la ingestión de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg, respectivamente.

La C_{\max} resultante del consumo de la dosis más alta de aceitunas fue dos veces mayor que la C_{\max} obtenida por el consumo de la dosis más pequeña de Arbequinas. Al finalizar el estudio y después de 8 horas de la administración intragástrica de las aceitunas, las concentraciones plasmáticas de este metabolito fueron superiores al 5 nM y al 10 nM para las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg, respectivamente.

Además, el $AUC_{0-\infty}$ y el AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después de la ingestión de la dosis

de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($p < 0,05$). Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el MMA1c representó el 12% en ambas dosis de Arbequinas (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado MMA1c y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	p^*
Concentraciones plasmáticas de MMA1c (nM)			
0,5 h	2,25 ± 0,30	5,11 ± 1,00	0,042
1 h	3,57 ± 0,54	8,35 ± 0,77	0,001
1,5 h	3,69 ± 0,52	10,3 ± 1,10	0,001
2 h	4,47 ± 0,58	15,1 ± 0,90	0,001
3 h	-- ^a	19,6 ± 2,13	--
4 h	9,50 ± 0,69	22,8 ± 2,45	0,001
6 h	7,70 ± 0,98	17,8 ± 2,64	0,006
8 h	5,04 ± 0,80	11,1 ± 1,55	0,025
Parámetros farmacocinéticos del MMA1c			
T_{max} (h)	4,50 ± 0,33	4,91 ± 0,62	0,586
C_{max} (nM)	9,72 ± 0,69	23,3 ± 2,99	0,002
AUC_{extrap} (%)	32,3 ± 6,43	29,0 ± 4,01	0,697
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	66,5 ± 9,19	153 ± 19,4	0,002
AUC_{last} (nM·h)	43,7 ± 5,73	96,6 ± 11,0	0,002
λ_z (1/h)	0,31 ± 0,05	0,31 ± 0,04	0,931
$t_{1/2}$ (h)	2,65 ± 0,55	2,46 ± 0,42	0,796
$MTR_{0-\infty}$ (h)	6,52 ± 0,65	5,92 ± 0,69	0,543
MTR_{last} (h)	4,22 ± 0,16	4,23 ± 0,29	0,961

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de las dosis 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

e) Metabolito monohidroxiado MMA1d

El metabolito denominado MMA1d solo fue detectado tras la ingesta de 7,70 g de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal ($n = 7$). A las 0,5 horas post-administración, las concentraciones plasmáticas de este metabolito fueron de $0,80 \pm 0,11$ nM. A la primera hora, aumentaron a $1,14 \pm 0,18$ nM. Después, a las 1,5 horas, la concentración en plasma fue de $1,23 \pm 0,19$ nM. A continuación, a las 2 horas, fue de $1,57 \pm 0,22$ nM. A las 3 horas post-administración, el MMA1d alcanzó su máxima concentración plasmática siendo de $2,50 \pm 0,24$ nM. Posteriormente, a las 4 y 6 horas post-

Resultados

administración, su presencia en plasma disminuyó hasta $1,77 \pm 0,30$ nM y $1,49 \pm 0,12$ nM, respectivamente. La última concentración plasmática se cuantificó a las 8 horas del experimento, siendo de $1,10 \pm 0,12$ nM (Figura 4.17).

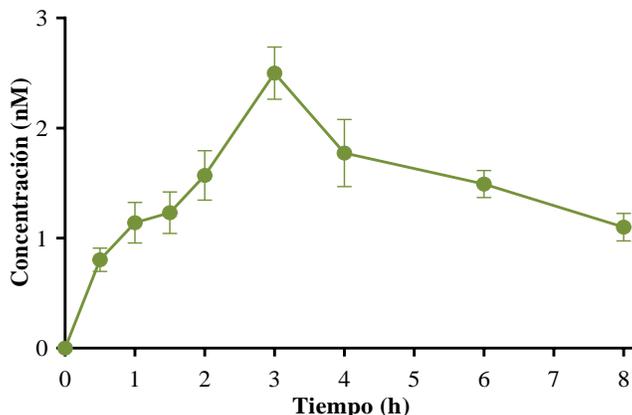


Figura 4.17. Concentraciones de MMA1d encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representa la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal (línea verde, $n = 7$). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media.

En relación con la farmacocinética de este metabolito, después del consumo de 7,70 g de aceitunas/kg, la T_{max} fue de $3,30 \pm 0,30$ horas, la C_{max} fue de $2,33 \pm 0,19$ nM, el AUC_{extrap} de $34,3 \pm 6,16\%$, el $AUC_{0-\infty}$ de $16,0 \pm 2,17$ nM·h, el AUC_{last} de $9,99 \pm 1,08$ nM·h, la λ_z de $3,58 \pm 0,65$ 1/h, la $t_{1/2}$ de $3,58 \pm 0,65$ horas, el $MTR_{0-\infty}$ de $6,94 \pm 0,77$ horas y el MTR_{last} de $3,81 \pm 0,17$ horas. El MMA1d representó el 1% del AUC_{last} total en esta dosis de aceitunas.

f) Metabolito monohidroxiado y deshidrogenado MMA2

Este metabolito se encontró solamente después del consumo de 7,70 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal ($n = 7$) y en la fase terminal del experimento. Las primeras concentraciones detectadas se encontraron después de 2 horas de la administración de las aceitunas ($0,65 \pm 0,11$ nM). Después de 3 y 4 horas, los valores aumentaron a $0,95 \pm 0,03$ nM y $1,27 \pm 0,26$ nM, respectivamente. A las 6 horas, se encontró en su máxima concentración a $2,37 \pm 0,53$ nM. Finalmente, a las 8 horas, su concentración en plasma bajó a $0,68 \pm 0,04$ nM. Por último, y debido al comportamiento del MMA2, no fue posible calcular sus parámetros farmacocinéticos.

g) Metabolito dihidroxilado MMA3a

El MMA3a fue detectado en plasma desde las 0,5 horas hasta las 8 horas posteriores a la administración de cualquiera de las dos dosis de aceitunas Arbequina sin sobrepasar el 1 nM en ningún momento durante el experimento (Figura 4.18).

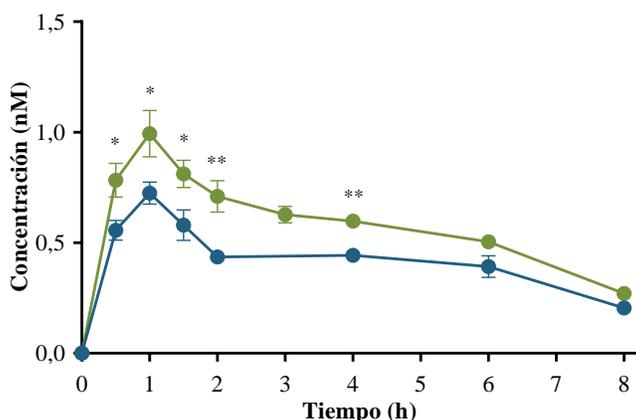


Figura 4.18. Concentraciones de MMA3a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabla 4.15. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxilado MMA3a y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	p^*
Concentraciones plasmáticas de MMA3a (nM)			
0,5 h	0,56 \pm 0,05	0,78 \pm 0,08	0,039
1 h	0,73 \pm 0,05	0,99 \pm 0,11	0,037
1,5 h	0,58 \pm 0,07	0,81 \pm 0,06	0,030
2 h	0,43 \pm 0,02	0,71 \pm 0,07	0,008
3 h	-- ^a	0,63 \pm 0,04	--
4 h	0,44 \pm 0,03	0,60 \pm 0,03	0,004
6 h	0,39 \pm 0,05	0,50 \pm 0,03	0,065
8 h	0,21 \pm 0,03	0,27 \pm 0,03	0,193
Parámetros farmacocinéticos del MMA3a			
T_{max} (h)	1,00 \pm 0,13	1,17 \pm 0,22	0,536
C_{max} (nM)	0,76 \pm 0,05	1,01 \pm 0,07	0,015
AUC _{extrap} (%)	37,1 \pm 6,07	30,9 \pm 4,72	0,432
AUC _{0-∞} (nM·h)	4,44 \pm 0,20	6,02 \pm 0,47	0,024
AUC _{last} (nM·h)	2,82 \pm 0,21	4,04 \pm 0,08	0,001
λ_z (1/h)	0,19 \pm 0,25	0,22 \pm 0,03	0,555
$t_{1/2}$ (h)	3,84 \pm 0,54	3,49 \pm 0,44	0,625
MTR _{0-∞} (h)	6,39 \pm 0,75	6,07 \pm 1,34	0,713
MTR _{last} (h)	3,03 \pm 0,22	3,26 \pm 0,16	0,398

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de las dosis 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

Resultados

Además, como se puede observar en la tabla 4.15, las concentraciones en plasma de MMA3a producidas por la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg ($n = 7$) fueron estadísticamente superiores a las producidas por la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($n = 6$) durante las primeras 4 horas del estudio ($p < 0,05$). En relación con la farmacocinética de este metabolito, la T_{max} del MMA3a se encontró a la primera hora de la administración intragástrica de cualquiera de las dosis de aceitunas Arbequina. Además, la C_{max} , el $AUC_{0-\infty}$ y el AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después de la ingestión de la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($p < 0,05$). Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el MMA3a representó el 1% en ambas dosis de Arbequinas (Tabla 4.15).

h) Metabolito dihidroxilado MMA3b

La concentración plasmática del metabolito MMA3b fue mayor que su isómero el metabolito MMA3a durante todo el experimento. Como se muestra en la figura 4.19 y en la tabla 4.16, el MMA3b se pudo detectar desde las 0,5 horas hasta las 8 horas posteriores a la administración de cualquiera de las dosis de aceitunas, siendo estadísticamente superior las concentraciones en plasma producidas por la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg ($n = 7$) en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($n = 6$) durante todo el estudio ($p < 0,05$).

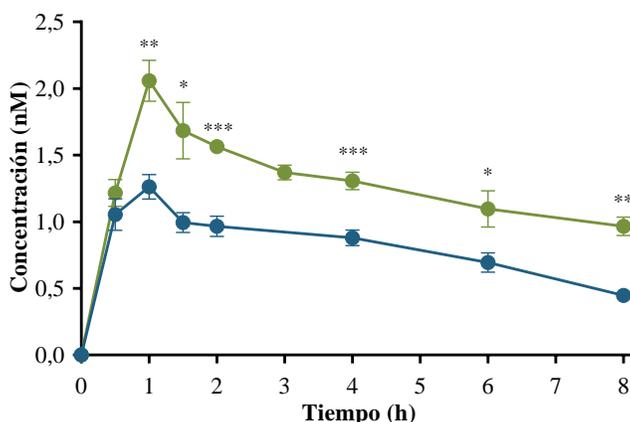


Figura 4.19. Concentraciones de MMA3b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los resultados de la farmacocinética del MMA3b indicaron que el T_{max} fue alcanzado después de 1,87 horas y 1,31 horas de la ingestión de las dosis de 3,85 g de aceitunas/kg y 7,70 g de aceitunas/kg, respectivamente. Al igual que su isómero, la C_{max} , el $AUC_{0-\infty}$ y el AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después de la ingestión de la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($p < 0,05$). Por último y al igual que su isómero, el MMA3b representó el 1% del

AUC_{last} total en ambas dosis de aceitunas (Tabla 4.16).

Tabla 4.16. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxilado MMA3b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	<i>p</i> [*]
Concentraciones plasmáticas de MMA3b (nM)			
0,5 h	1,06 ± 0,12	1,22 ± 0,10	0,344
1 h	1,26 ± 0,09	2,06 ± 0,15	0,002
1,5 h	1,00 ± 0,07	1,68 ± 0,21	0,015
2 h	0,97 ± 0,08	1,56 ± 0,05	0,001
3 h	-- ^a	1,37 ± 0,05	--
4 h	0,88 ± 0,06	1,31 ± 0,07	0,001
6 h	0,70 ± 0,07	1,10 ± 0,14	0,031
8 h	0,45 ± 0,01	0,97 ± 0,07	0,002
Parámetros farmacocinéticos del MMA3b			
T _{max} (h)	1,87 ± 0,86	1,31 ± 0,14	0,506
C _{max} (nM)	1,24 ± 0,08	2,05 ± 0,13	0,001
AUC _{extrap} (%)	26,1 ± 3,11	32,4 ± 4,13	0,260
AUC _{0-∞} (nM·h)	7,87 ± 0,40	13,6 ± 1,04	0,001
AUC _{last} (nM·h)	5,78 ± 0,26	8,94 ± 0,38	0,001
λ _z (1/h)	0,27 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,328
t _{1/2} (h)	2,85 ± 0,44	3,43 ± 0,48	0,391
MTR _{0-∞} (h)	5,45 ± 0,36	6,32 ± 0,70	0,315
MTR _{last} (h)	3,38 ± 0,22	3,42 ± 0,24	0,915

^aNo se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de las dosis 3,85 g (*n* = 6) y 7,70 g (*n* = 7) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante *t* de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

i) Metabolito dihidroxilado y deshidrogenado MMA4

De todos los derivados del ácido maslínico, el MMA4 fue el metabolito que se encontró en mayor concentración en plasma. Como se observa en la figura 4.20, cuando las ratas consumieron 7,70 g de aceitunas/kg, la concentración plasmática de este metabolito fue estadísticamente superior a las 0,5 horas y a las 1,5 horas en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg (*p*<0,05). En relación con la farmacocinética de este metabolito, la T_{max}, la C_{max}, el AUC_{0-∞} y el AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después de la ingestión de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg (*p*<0,05).

Resultados

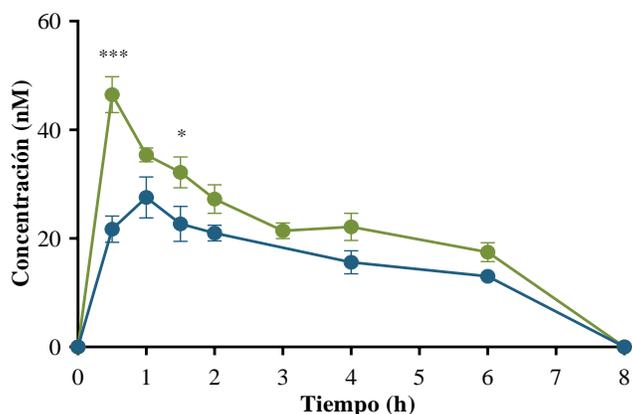


Figura 4.20. Concentraciones de MMA4 encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Tabla 4.17. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxilado y deshidrogenado MMA4 y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	p^{**}
Concentraciones plasmáticas de MMA4 (nM)			
0,5 h	21,7 \pm 2,41	46,5 \pm 3,32	0,001
1 h	27,5 \pm 3,78	35,4 \pm 1,30	0,078
1,5 h	22,7 \pm 3,23	32,2 \pm 2,85	0,050
2 h	21,0 \pm 1,46	27,2 \pm 2,62	0,063
3 h	-- ^a	21,4 \pm 1,45	--
4 h	15,6 \pm 2,12	22,1 \pm 2,52	0,092
6 h	13,0 \pm 0,38	17,5 \pm 1,76	0,068
8 h	0,00	0,00	--
Parámetros farmacocinéticos del MMA4			
T_{max} (h)	1,35 \pm 0,17	0,76 \pm 0,13	0,016
C_{max} (nM)	30,7 \pm 2,95	47,4 \pm 2,89	0,002
AUC_{extrap} (%)	36,0 \pm 6,60	26,9 \pm 3,23	0,223
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	136 \pm 13,8	187 \pm 17,2	0,047
AUC_{last} (nM·h)	87,1 \pm 11,3	136 \pm 13,5	0,020
λ_z (1/h)	0,29 \pm 0,03	0,30 \pm 0,02	0,880
$t_{1/2}$ (h)	2,50 \pm 0,28	2,39 \pm 0,18	0,735
$MTR_{0-\infty}$ (h)	4,45 \pm 0,41	4,00 \pm 0,29	0,383
MTR_{last} (h)	2,35 \pm 0,30	2,33 \pm 0,14	0,943

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de las dosis 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

Por otro lado, no se detectaron concentraciones plasmáticas de MMA4 8 horas después de la administración de cualquiera de las dosis de aceitunas. Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados, el MMA4 representó el mayor porcentaje, siendo de 21% y 17% para las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg, respectivamente (Tabla 4.17).

j) Metabolito monohidroxilado y deshidrogenado con adición de un ácido glucurónico MMA5

El MMA5 fue el único metabolito que presentó una reacción de conjugación con un ácido glucurónico, presentando una biotransformación de fase II, además, pudiera ser derivado del metabolito MMA2 descrito anteriormente. En la figura 4.21 se puede observar que el MMA5 estuvo presente en el sistema circulatorio durante las 8 horas del experimento en ambas dosis de aceitunas, siendo estadísticamente superiores las concentraciones plasmáticas producidas por la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg ($n = 7$) en comparación con las aportadas por la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($n = 6$), ($p < 0,05$). En la tabla 4.18 se presentan las concentraciones plasmáticas del MMA5 producidas por la administración de ambas dosis de aceitunas durante las 8 horas del experimento.

Los resultados de la farmacocinética del MMA5 mostraron que después de 2,33 horas de la administración de 3,85 g de aceitunas/kg la C_{max} fue de $3,15 \pm 0,32$ nM. Por otra parte, la C_{max} de este metabolito estuvo cerca de triplicarse con $8,90 \pm 0,44$ nM después de 1,60 horas de la administración intragástrica de la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg (Tabla 4.18). Además, el $AUC_{0-\infty}$ y el AUC_{last} fueron tres veces mayores y estadísticamente superiores ($p < 0,05$) después de la ingestión de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg. Por último, el MMA5 comprendió el 3% y el 5% del AUC_{last} total para las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg.

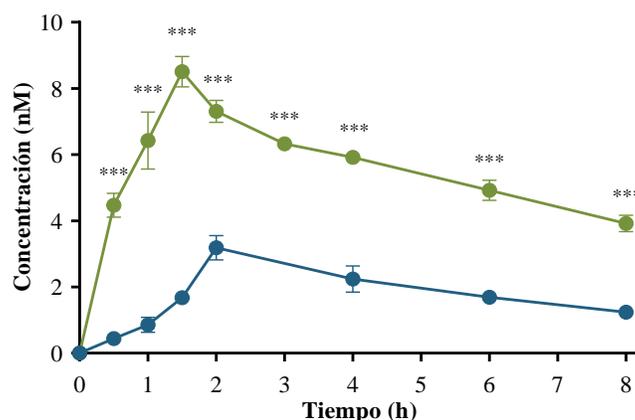


Figura 4.21. Concentraciones de MMA5 encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: *** $p < 0,001$

Resultados

Tabla 4.18. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxilado y deshidrogenado con adición de un ácido glucurónico MMA5 y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	<i>p</i> [*]
Concentraciones plasmáticas de MMA5 (nM)			
0,5 h	0,44 ± 0,09	4,47 ± 0,36	0,001
1 h	0,85 ± 0,23	6,43 ± 0,87	0,001
1,5 h	1,67 ± 0,08	8,51 ± 0,46	0,001
2 h	3,19 ± 0,37	7,31 ± 0,33	0,001
3 h	-- ^a	6,32 ± 0,19	--
4 h	2,25 ± 0,40	5,92 ± 0,20	0,001
6 h	1,69 ± 0,13	4,92 ± 0,31	0,001
8 h	1,24 ± 0,11	3,92 ± 0,25	0,001
Parámetros farmacocinéticos del MMA5			
T _{max} (h)	2,33 ± 0,44	1,60 ± 0,14	0,118
C _{max} (nM)	3,15 ± 0,32	8,90 ± 0,44	0,001
AUC _{extrap} (%)	28,9 ± 2,24	41,1 ± 2,49	0,004
AUC _{0-∞} (nM·h)	17,7 ± 1,43	67,9 ± 4,41	0,001
AUC _{last} (nM·h)	12,4 ± 0,63	39,7 ± 2,38	0,001
λ _z (1/h)	0,25 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,035
t _{1/2} (h)	3,10 ± 0,42	4,76 ± 0,43	0,019
MTR _{0-∞} (h)	6,02 ± 0,43	7,73 ± 0,58	0,043
MTR _{last} (h)	3,76 ± 0,13	3,44 ± 0,17	0,162

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de las dosis 3,85 g (*n* = 6) y 7,70 g (*n* = 7) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante *t* de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

4.2.3.2. Ácido oleanólico y sus metabolitos

a) Ácido oleanólico

El ácido oleanólico estuvo presente en el plasma de los animales después del consumo de ambas dosis de aceitunas durante las 8 horas del estudio, siendo estadísticamente superiores (*p* < 0,05) las concentraciones plasmáticas del triterpeno a las 0,5, 1, 1,5, 4 y 6 horas después de la ingestión de 7,70 g de aceitunas/kg (*n* = 7) en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg (*n* = 6) (Figura 4.22). En relación con la farmacocinética, la C_{max}, el AUC_{0-∞} y el AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después de la ingestión de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg (*p* < 0,05). Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido oleanólico y sus derivados; el ácido oleanólico comprendió el 25% y el 22% para las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg (Tabla 4.19).

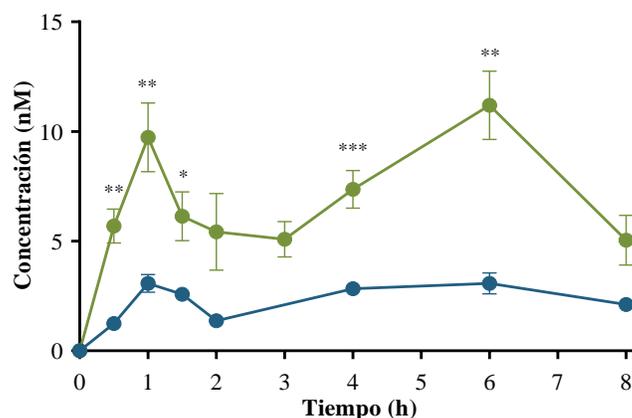


Figura 4.22. Concentraciones de ácido oleanólico encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla 4.19. Concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	p^*
Concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico (nM)			
0,5 h	1,24 \pm 0,06	5,70 \pm 0,78	0,006
1 h	3,07 \pm 0,41	9,74 \pm 1,57	0,002
1,5 h	2,58 \pm 0,27	6,13 \pm 1,12	0,015
2 h	1,37 \pm 0,25	5,42 \pm 1,75	0,051
3 h	-- ^a	5,09 \pm 0,81	--
4 h	2,83 \pm 0,25	7,37 \pm 0,86	0,001
6 h	3,08 \pm 0,48	11,2 \pm 1,56	0,001
8 h	2,11 \pm 0,27	5,04 \pm 1,14	0,143
Parámetros farmacocinéticos del ácido oleanólico			
T_{max} (h)	6,67 \pm 0,42	6,26 \pm 0,88	0,516
C_{max} (nM)	3,61 \pm 0,25	11,4 \pm 1,21	0,001
AUC_{extrap} (%)	21,6 \pm 3,61	41,1 \pm 16,6	0,481
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	19,9 \pm 3,99	103 \pm 17,2	0,032
AUC_{last} (nM·h)	15,8 \pm 1,34	42,2 \pm 9,25	0,024
λ_z (1/h)	0,41 \pm 0,02	0,28 \pm 0,13	0,552
$t_{1/2}$ (h)	1,71 \pm 0,09	6,33 \pm 2,93	0,352
$MTR_{0-\infty}$ (h)	5,22 \pm 0,52	11,1 \pm 3,82	0,362
MTR_{last} (h)	3,74 \pm 0,26	3,50 \pm 0,40	0,647

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de las dosis 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

Resultados

b) Metabolito monohidroxilado MOA1a

El metabolito MOA1a solo fue detectado tras la ingesta de 7,70 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal ($n=7$). A las 0,5 horas post-administración, las concentraciones plasmáticas de este metabolito fueron de $1,76 \pm 0,19$ nM. A la primera hora, alcanzó su máxima concentración plasmática siendo de $2,16 \pm 0,18$ nM. Después, a las 1,5 horas, la concentración en plasma disminuyó a $1,96 \pm 0,17$ nM. A continuación, a las 2 y 3 horas, se encontró a $1,66 \pm 0,14$ nM y $1,40 \pm 0,13$ nM, respectivamente. Posteriormente, a las 4 y 6 horas post-administración, su presencia en plasma disminuyó hasta $1,18 \pm 0,16$ nM y $0,90 \pm 0,13$ nM. La última concentración plasmática se cuantificó a las 8 horas del experimento, siendo de $0,75 \pm 0,02$ nM (Figura 4.23).

En relación con la farmacocinética de este metabolito, después del consumo de 7,70 g de aceitunas/kg, la T_{max} fue de $1,06 \pm 0,14$ horas, la C_{max} fue de $2,21 \pm 0,19$ nM, el AUC_{extrap} de $23,7 \pm 2,32\%$, el $AUC_{0-\infty}$ de $11,4 \pm 0,93$ nM·h, el AUC_{last} de $8,67 \pm 0,72$ nM·h, la λ_z de $0,25 \pm 0,02$ 1/h, la $t_{1/2}$ de $2,97 \pm 0,39$ horas, el $MTR_{0-\infty}$ de $4,93 \pm 0,51$ horas y el MTR_{last} de $2,98 \pm 0,16$ horas. El MOA1a representó el 5% del AUC_{last} total en esta dosis de aceitunas.

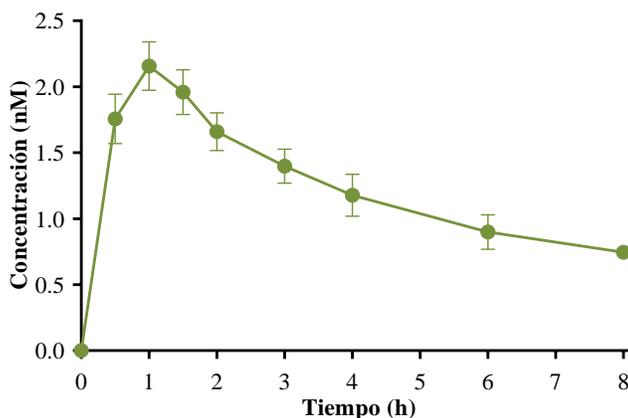


Figura 4.23. Concentraciones de MOA1a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representa la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal (línea verde, $n=7$). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media.

c) Metabolito monohidroxilado MOA1b

Este metabolito fue detectado en el plasma de los animales en ambas dosis de aceitunas sin sobrepasar el 3 nM en ningún momento durante el experimento (Figura 4.24). Además, las concentraciones en plasma de MOA1b producidas por la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg ($n=7$) fueron estadísticamente superiores a las producidas por la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($n=6$) durante las primeras 6 horas del estudio ($p<0,05$). A las 8 horas, no se detectaron concentraciones plasmáticas de MOA1b después del consumo de la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg (Tabla 4.20).

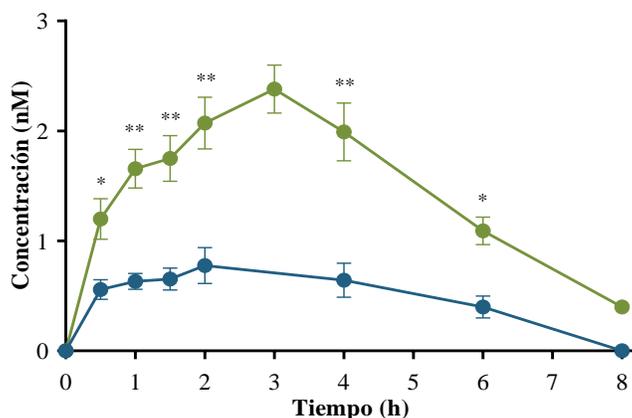


Figura 4.24. Concentraciones de MOA1b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabla 4.20. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado MOA1b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	p^*
Concentraciones plasmáticas de MOA1b (nM)			
0,5 h	0,56 \pm 0,09	1,20 \pm 0,18	0,034
1 h	0,63 \pm 0,07	1,66 \pm 0,18	0,002
1,5 h	0,65 \pm 0,10	1,75 \pm 0,21	0,004
2 h	0,78 \pm 0,16	2,07 \pm 0,24	0,004
3 h	-- ^a	2,38 \pm 0,22	--
4 h	0,65 \pm 0,15	1,99 \pm 0,26	0,006
6 h	0,40 \pm 0,10	1,09 \pm 0,13	0,028
8 h	0,00	0,40 \pm 0,03	--
Parámetros farmacocinéticos del MOA1b			
T_{max} (h)	2,43 \pm 0,57	3,77 \pm 0,46	0,103
C_{max} (nM)	0,84 \pm 0,13	2,30 \pm 0,23	0,002
AUC_{extrap} (%)	34,6 \pm 11,1	17,2 \pm 4,55	0,120
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	4,82 \pm 0,64	12,8 \pm 1,24	0,001
AUC_{last} (nM·h)	3,23 \pm 0,79	10,4 \pm 0,90	0,001
λ_z (1/h)	0,34 \pm 0,10	0,46 \pm 0,07	0,305
$t_{1/2}$ (h)	2,76 \pm 0,85	1,77 \pm 0,33	0,226
$MTR_{0-\infty}$ (h)	5,18 \pm 1,06	4,44 \pm 0,33	0,420
MTR_{last} (h)	2,60 \pm 0,22	3,34 \pm 0,15	0,018

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de las dosis 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

Resultados

En relación con la farmacocinética de este metabolito, la C_{max} , el $AUC_{0-\infty}$ y el AUC_{last} fueron tres veces mayores y estadísticamente superiores ($p < 0,05$) después de la ingestión de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg. Por otra parte, el AUC_{extrap} de la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg fue menor al 20%, lo cual indicaría que, a esta dosis, las fracciones extrapolables al infinito fueron suficientemente precisas. Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido oleanólico y sus derivados; el MOA1b representó el 5% y el 6% para las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg (Tabla 4.20).

d) Metabolito monohidroxilado MOA1c

De todos los derivados del ácido oleanólico, el MOA1c fue el metabolito que se encontró en mayor concentración en plasma. Como se observa en la figura 4.25, cuando las ratas consumieron 7,70 g de aceitunas/kg ($n = 7$), la concentración plasmática de este metabolito fue estadísticamente superior durante las 8 horas del experimento en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($n = 6$), ($p < 0,05$).

En relación con la farmacocinética, la T_{max} se alcanzó cerca de las 6 horas posteriores al consumo de las Arbequinas, siendo la C_{max} , el $AUC_{0-\infty}$ y el AUC_{last} estadísticamente superiores después de la ingestión de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($p < 0,05$). Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido oleanólico y sus derivados, el MOA1c presentó el mayor porcentaje, superando incluso a los valores presentados por el compuesto padre. Así, el porcentaje de AUC_{last} de MOA1c fue de 49% y 51% para las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg, respectivamente (Tabla 4.21).

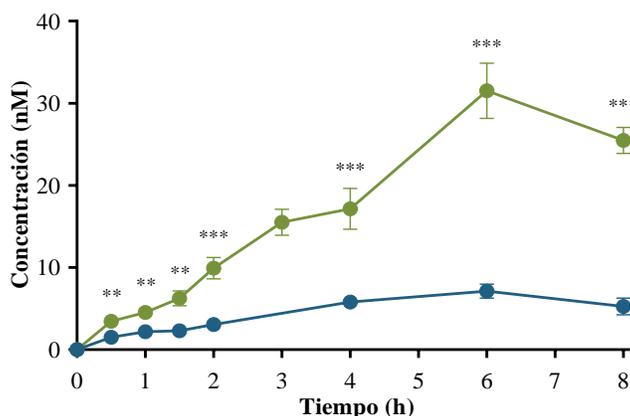


Figura 4.25. Concentraciones de MOA1c encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla 4.21. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxilado MOA1c y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	<i>p</i> [*]
Concentraciones plasmáticas de MOA1c (nM)			
0,5 h	1,52 ± 0,22	3,46 ± 0,45	0,006
1 h	2,20 ± 0,29	4,54 ± 0,47	0,002
1,5 h	2,30 ± 0,32	6,25 ± 0,90	0,003
2 h	3,08 ± 0,22	9,93 ± 1,30	0,001
3 h	-- ^a	15,5 ± 1,60	--
4 h	5,79 ± 0,57	17,1 ± 2,48	0,001
6 h	7,96 ± 0,20	31,5 ± 3,37	0,001
8 h	5,26 ± 1,02	25,5 ± 1,60	0,001
Parámetros farmacocinéticos del MOA1c			
T _{max} (h)	5,72 ± 0,32	5,96 ± 0,53	0,717
C _{max} (nM)	7,14 ± 0,84	28,1 ± 3,40	0,001
AUC _{extrap} (%)	43,4 ± 19,4	73,6 ± 8,06	0,224
AUC _{0-∞} (nM·h)	112 ± 59,1	413 ± 84,7	0,044
AUC _{last} (nM·h)	30,7 ± 5,33	97,0 ± 15,5	0,003
λ _z (1/h)	0,23 ± 0,10	0,08 ± 0,02	0,187
t _{1/2} (h)	7,39 ± 5,30	9,99 ± 1,96	0,669
MTR _{0-∞} (h)	13,8 ± 7,52	17,2 ± 2,52	0,686
MTR _{last} (h)	4,22 ± 0,37	4,74 ± 0,51	0,441

^aNo se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de las dosis 3,85 g (*n* = 6) y 7,70 g (*n* = 7) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante *t* de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

e) Metabolito con adición de un grupo sulfato MOA2a

Las concentraciones en plasma de MOA2a producidas por la administración de 7,70 g de aceitunas/kg (*n* = 7) fueron estadísticamente superiores a las producidas por la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg (*n* = 6) desde las 0,5 horas hasta las 2 horas del experimento (*p* < 0,05). Después de 4 horas del consumo de 3,85 g de aceitunas/kg, el MOA2a estuvo presente en el plasma de todos los animales y posteriormente, a las 6 y 8 horas, solo se detectaron pequeñas concentraciones de este metabolito en una rata (Figura 4.26). Respecto a la farmacocinética, la C_{max} producida por la ingestión de 3,85 g de aceitunas/kg fue de 0,76 ± 0,08 nM, mientras que la C_{max} producida por el consumo de 7,70 g de aceitunas/kg fue tres veces mayor con 2,83 ± 0,11 nM. Por último, este metabolito representó el 4% del AUC_{last} total en ambas dosis de aceitunas (Tabla 4.22).

Resultados

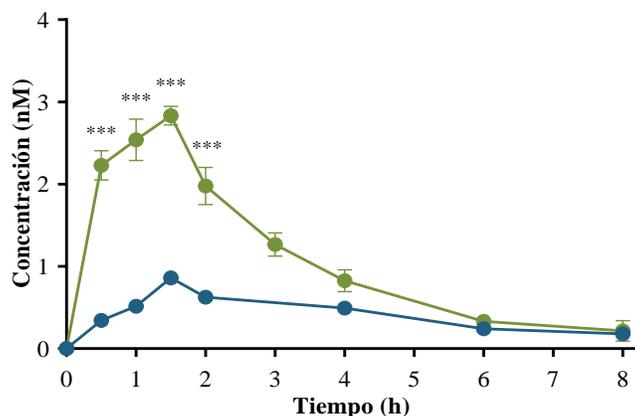


Figura 4.26. Concentraciones de MOA2a encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando ambos grupos: *** $p < 0,001$.

Tabla 4.22. Concentraciones plasmáticas del metabolito al que se le agregó un grupo sulfato MOA2a y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	p^*
Concentraciones plasmáticas de MOA2a (nM)			
0,5 h	0,34 \pm 0,03	2,23 \pm 0,18	0,001
1 h	0,52 \pm 0,02	2,54 \pm 0,25	0,001
1,5 h	0,86 \pm 0,06	2,83 \pm 0,11	0,001
2 h	0,62 \pm 0,08	1,98 \pm 0,23	0,001
3 h	-- ^a	1,27 \pm 0,14	--
4 h	0,49 \pm 0,06	0,82 \pm 0,13	0,055
6 h	0,24	0,33 \pm 0,05	--
8 h	0,18	0,22 \pm 0,12	--
Parámetros farmacocinéticos del MOA2a			
T_{max} (h)	2,02 \pm 0,42	1,47 \pm 0,08	0,201
C_{max} (nM)	0,76 \pm 0,08	2,83 \pm 0,11	0,001
AUC_{extrap} (%)	39,5 \pm 8,74	7,04 \pm 1,53	0,002
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	4,67 \pm 0,97	9,07 \pm 0,58	0,002
AUC_{last} (nM·h)	2,45 \pm 0,18	8,42 \pm 0,51	0,001
λ_z (1/h)	0,27 \pm 0,06	0,52 \pm 0,09	0,054
$t_{1/2}$ (h)	3,24 \pm 0,71	1,51 \pm 0,16	0,027
$MTR_{0-\infty}$ (h)	5,78 \pm 2,45	2,82 \pm 0,32	0,008
MTR_{last} (h)	2,66 \pm 0,25	2,36 \pm 0,07	0,249

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de las dosis 3,85 g ($n = 6$) y 7,70 g ($n = 7$) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante t de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

f) Metabolito con adición de un grupo sulfato MOA2b

El MOA2b fue detectado en plasma desde las 0,5 horas hasta las 8 horas posteriores a la administración de cualquiera de las dos dosis de aceitunas Arbequina (Figura 4.27). Además, como se puede observar en la tabla 4.23, las concentraciones en plasma de MOA2b producidas por la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg ($n = 7$) fueron estadísticamente superiores a las producidas por la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($n = 6$) durante las primeras 6 horas del estudio ($p < 0,05$).

En relación con la farmacocinética de este metabolito, la C_{max} , el $AUC_{0-\infty}$ y el AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después de la ingestión de la dosis de 7,70 g de aceitunas/kg en comparación con la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg ($p < 0,05$). Por último, del AUC_{last} total que acumularon el ácido oleanólico y sus derivados; el MOA2b representó el 17% y 11% para las dosis de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg, respectivamente (Tabla 4.23).

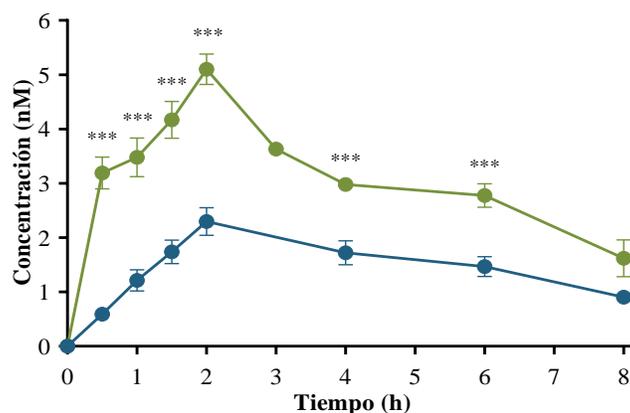


Figura 4.27. Concentraciones de MOA2b encontradas en el plasma de las ratas Sprague-Dawley después de la administración de las aceitunas. Se representan las dosis de 3,85 g (línea azul, $n = 6$) y 7,70 g (línea verde, $n = 7$) de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante *t* de Student comparando ambos grupos: *** $p < 0,001$.

Resultados

Tabla 4.23. Concentraciones plasmáticas del metabolito al que se le agregó un grupo sulfato MOA2b y sus parámetros farmacocinéticos después de la administración de 3,85 g y 7,70 g de aceitunas/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley.

	Dosis 3,85 g/kg de peso	Dosis 7,70 g/kg de peso	<i>p</i> [*]
Concentraciones plasmáticas de MOA2b (nM)			
0,5 h	0,59 ± 0,08	3,19 ± 0,29	0,001
1 h	1,21 ± 0,20	3,48 ± 0,36	0,001
1,5 h	1,74 ± 0,22	4,17 ± 0,34	0,001
2 h	2,30 ± 0,26	5,10 ± 0,28	0,001
3 h	-- ^a	3,63 ± 0,09	--
4 h	1,72 ± 0,22	2,98 ± 0,10	0,001
6 h	1,47 ± 0,18	2,77 ± 0,22	0,001
8 h	0,90 ± 0,09	1,62 ± 0,34	0,110
Parámetros farmacocinéticos del MOA2b			
T _{max} (h)	3,02 ± 1,69	1,69 ± 0,41	0,067
C _{max} (nM)	2,36 ± 0,63	5,15 ± 0,76	0,001
AUC _{extrap} (%)	30,2 ± 13,7	32,6 ± 10,2	0,728
AUC _{0-∞} (nM·h)	15,3 ± 1,51	32,8 ± 5,92	0,001
AUC _{last} (nM·h)	10,5 ± 1,78	21,7 ± 2,84	0,001
λ _z (1/h)	0,25 ± 0,05	0,19 ± 0,02	0,253
t _{1/2} (h)	3,34 ± 1,53	3,75 ± 0,85	0,564
MTR _{0-∞} (h)	6,37 ± 0,77	6,26 ± 0,46	0,900
MTR _{last} (h)	3,62 ± 0,40	3,27 ± 0,32	0,111

^a No se extrajo muestra de sangre a este tiempo. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de las dosis 3,85 g (*n* = 6) y 7,70 g (*n* = 7) de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal. * Los datos fueron analizados mediante *t* de Student comparando las dos dosis de aceitunas.

4.3. Capítulo III. Efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina en la presión arterial y el peso corporal en ratas normotensas e hipertensas

El efecto de la administración de 3,85 g de aceitunas/kg sobre la presión arterial (PA), se evaluó en ratas WKY y SHR. Para ello, se utilizaron las aceitunas de la variedad Arbequina de la cosecha 2016-2017 cuyas concentraciones de triterpenos y polifenoles se describen en el apartado 4.1.2.3. La suspensión de aceitunas se suministró de acuerdo con peso corporal de cada animal al momento de la administración.

En la tabla 4.24, se muestra la dosis y la cantidad promedio de estos compuestos administrados a los animales.

Tabla 4.24. Dosis de triterpenos pentacíclicos y polifenoles administrados a las ratas WKY y SHR en el estudio del efecto del consumo de aceitunas en la presión arterial.

Compuesto	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a	Cantidad administrada (μg) ^b	Cantidad administrada (nM) ^b
<i>Triterpenos pentacíclicos</i>			
Ácido maslínico	9026	2947 \pm 219	6235 \pm 464
Ácido oleanólico	3322	1085 \pm 80,8	2375 \pm 177
Eritrodiol	40,3	13,1 \pm 0,98	29,7 \pm 2,21
<i>Polifenoles</i>			
Apigenina	17,4	5,68 \pm 0,42	21,0 \pm 1,57
Ácido cafeico	17,9	5,85 \pm 0,44	32,4 \pm 2,42
Ácido <i>p</i> -cumárico	21,8	7,10 \pm 0,53	43,3 \pm 3,22
Ácido vanílico	13,7	4,49 \pm 0,33	26,7 \pm 1,99
Hidroxitirosol	1829	597 \pm 44,5	3874 \pm 288
Hidroxitirosol acetato	103,9	33,9 \pm 2,52	173 \pm 12,9
Luteolina	345,2	113 \pm 8,39	394 \pm 29,3
Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido	42,8	14,0 \pm 1,04	31,2 \pm 2,32
Oleuropeína	48,5	15,8 \pm 1,18	29,3 \pm 2,18
(+)-Pinoresinol	11,9	3,88 \pm 0,29	10,8 \pm 0,81
Quercetina	25,0	8,17 \pm 0,61	27,0 \pm 2,01
Rutina	100,2	32,7 \pm 2,44	53,6 \pm 3,99
Salidroside	66,9	21,8 \pm 1,63	72,7 \pm 5,41
Tirosol	89,0	29,1 \pm 2,16	210 \pm 15,7
Verbascósido	1288	421 \pm 31,3	674 \pm 50,1

^a Dosis de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal. ^b Cantidad promedio de polifenoles o triterpenos pentacíclicos administrados a las ratas. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media.

Resultados

4.3.1. Efecto de una dosis única de aceitunas de mesa en la presión arterial en ratas

La edad de los animales fue de 12 semanas. A esta edad, las ratas WKY asignadas al grupo control tuvieron un peso corporal de $253 \pm 5,85$ g ($n = 6$), mientras que las ratas asignadas al grupo de tratamiento con aceitunas pesaron $251 \pm 4,01$ g ($n = 7$). Respecto a los animales SHR, los pesos fueron $259 \pm 4,17$ g ($n = 7$) y $264 \pm 2,86$ g ($n = 8$) en el grupo control y en el tratado con aceitunas, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los grupos control y tratamiento con aceitunas de ambas cepas cuando se aplicó una *t* de Student ($p < 0,05$).

4.3.1.1. Presión arterial en ratas normotensas

Al inicio del experimento, la PA sistólica, diastólica y media fue similar entre las ratas normotensas del grupo control ($n = 5$) como en las asignadas al grupo de tratamiento con aceitunas Arbequina ($n = 8$). Posteriormente, y durante las 24 horas del estudio agudo, la PA de las ratas normotensas de ambos grupos se mantuvo estable. De esta manera, no se encontraron diferencias significativas tanto en el grupo WKY control como en el grupo WKY aceitunas, cuando se compararon los valores de PA de las 0 horas con los presentados en cada grupo a las 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas (Figura 4.28).

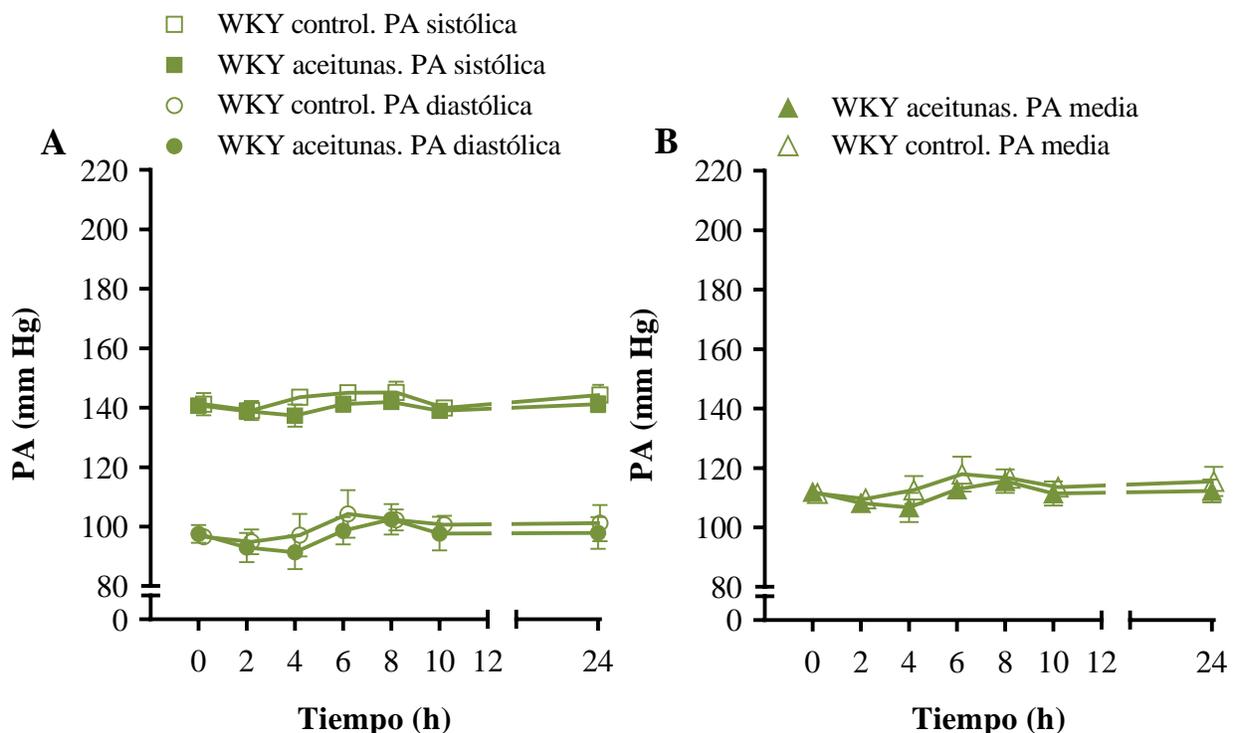


Figura 4.28. Presión arterial (PA) en ratas normotensas (WKY) de 12 semanas de edad después de la administración oral de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal. El gráfico muestra los valores de PA sistólica, diastólica (A) y media (B) durante 24 horas. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media del grupo WKY control ($n = 5$) y el grupo WKY aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer.

La similitud de los valores de PA presentados por las ratas WKY control y por las ratas WKY administradas con aceitunas, persistió durante todo el ensayo sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos desde las 2 hasta las 24 horas (Tabla 4.25). Sin embargo, se pudo observar una pequeña disminución a las 4 horas post-administración. A esta hora, la PA sistólica, diastólica y media fue 4%, 6% y 5% menor en las ratas que consumieron aceitunas, en comparación con las ratas del grupo control.

Tabla 4.25. Efecto de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas normotensas de 12 semanas de edad.

	PA sistólica (mm Hg)				PA diastólica (mm Hg)				PA media (mm Hg)			
	WKY control	WKY aceitunas	Δ	p^*	WKY control	WKY aceitunas	Δ	p^*	WKY control	WKY aceitunas	Δ	p^*
0 h	140,9 ± 3,8	140,8 ± 1,7	0	0,991	96,3 ± 1,7	97,6 ± 3,0	+1	0,717	111,2 ± 2,0	112,0 ± 2,0	+1	0,780
2 h	138,8 ± 3,3	138,9 ± 2,7	0	0,989	94,6 ± 4,2	92,9 ± 4,9	-2	0,803	109,3 ± 3,0	108, ± 2,9	-1	0,795
4 h	143,2 ± 2,1	137,4 ± 3,8	-6	0,206	96,8 ± 7,2	91,4 ± 5,6	-5	0,564	112,3 ± 4,7	106,7 ± 4,9	-6	0,431
6 h	144,8 ± 2,2	141,2 ± 2,6	-4	0,314	104,0 ± 8,1	98,6 ± 4,6	-5	0,578	117,6 ± 5,9	112,8 ± 3,1	-5	0,495
8 h	144,8 ± 3,7	142,0 ± 2,1	-3	0,532	102,0 ± 3,6	102,4 ± 5,1	0	0,943	116,2 ± 1,9	115,6 ± 4,0	-1	0,890
10 h	139,6 ± 2,2	138,9 ± 2,3	-1	0,843	100,3 ± 3,0	97,7 ± 5,7	-3	0,682	113,2 ± 1,0	111,4 ± 4,1	-2	0,676
24 h	144,0 ± 3,5	141,2 ± 2,7	-3	0,548	100,9 ± 6,1	97,9 ± 5,4	-3	0,721	115,2 ± 5,0	112,3 ± 3,8	-3	0,653

PA, presión arterial; h, horas post-administración; WKY, ratas Wistar Kyoto. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos WKY control ($n = 5$) y WKY aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. * comparado con el grupo control en el mismo tiempo observado.

4.3.1.2. Presión arterial en ratas hipertensas

Al inicio del ensayo y antes de la administración de aceitunas, la PA sistólica, diastólica y media de las ratas hipertensas del grupo control ($n = 7$) y de las ratas asignadas al grupo de tratamiento con aceitunas Arbequina ($n = 8$) fueron semejantes. Posteriormente, y durante las 24 horas del estudio agudo, la PA de las ratas hipertensas del grupo control se mantuvo estable. En cambio, cuando se compararon los valores de PA iniciales del grupo SHR aceitunas con los presentados durante de las 24 horas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la PA sistólica a partir de las 4 horas hasta las 24 horas y en la PA diastólica y media desde las 2 horas hasta las 10 horas posteriores a la administración de las aceitunas de mesa Arbequina (Figura 4.29). Los valores de la PA sistólica, diastólica y media de los animales SHR durante las 24 horas del estudio son presentados en la tabla 4.26.

Resultados

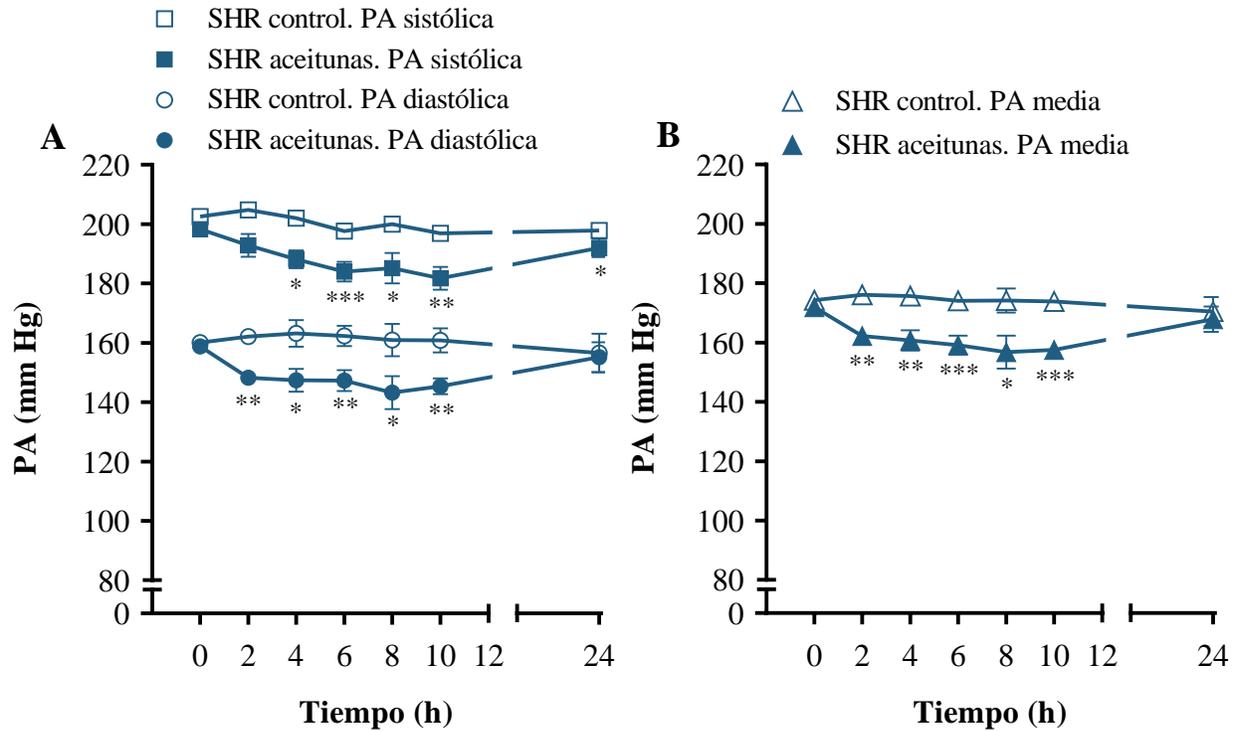


Figura 4.29. Presión arterial (PA) en ratas hipertensas (SHR) de 12 semanas de edad después de la administración oral de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal. El gráfico muestra los valores de PA sistólica, diastólica (A) y media (B) durante 24 horas. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media del grupo SHR control ($n = 7$) y el grupo SHR aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con el valor del tiempo 0 h del mismo grupo.

Tabla 4.26. Efecto de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas hipertensas de 12 semanas de edad.

	PA sistólica (mm Hg)				PA diastólica (mm Hg)				PA media (mm Hg)			
	SHR control	SHR aceitunas	Δ	p^*	SHR control	SHR aceitunas	Δ	p^*	SHR control	SHR aceitunas	Δ	p^*
0 h	202,5 \pm 1,7	198,3 \pm 2,1	-4	0,329	160,1 \pm 1,4	158,8 \pm 1,7	-1	0,559	174,2 \pm 1,3	172,0 \pm 1,3	-2	0,225
2 h	204,8 \pm 1,7	192,9 \pm 3,9	-12	0,007	162,1 \pm 2,4	148,2 \pm 2,5	-14	0,002	176,1 \pm 1,7	162,2 \pm 2,5	-14	0,001
4 h	202,0 \pm 2,4	188,2 \pm 3,1	-14	0,002	163,2 \pm 4,5	147,4 \pm 3,9	-16	0,027	175,7 \pm 2,9	160,7 \pm 3,5	-15	0,008
6 h	197,7 \pm 1,1	184,0 \pm 3,3	-14	0,002	162,3 \pm 3,4	147,3 \pm 3,6	-15	0,012	174,0 \pm 2,4	159,1 \pm 3,2	-15	0,004
8 h	199,9 \pm 2,3	185,1 \pm 5,2	-15	0,001	165,8 \pm 3,1	147,2 \pm 6,2	-19	0,044	174,2 \pm 4,1	156,8 \pm 5,6	-17	0,028
10 h	196,9 \pm 2,4	181,7 \pm 3,9	-15	0,001	160,8 \pm 4,0	145,4 \pm 2,7	-15	0,014	173,8 \pm 3,0	157,5 \pm 2,5	-16	0,002
24 h	197,9 \pm 2,0	192,0 \pm 3,1	-6	0,177	156,6 \pm 6,6	155,2 \pm 5,1	-1	0,871	170,5 \pm 4,9	167,9 \pm 4,3	-3	0,696

PA, presión arterial; h, horas post-administración; SHR, spontaneously hypertensive rats. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de los grupos SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. * comparado con el grupo control en el mismo tiempo observado.

Por otra parte, la administración oral de las aceitunas de mesa disminuyó de forma estadísticamente

significativa ($p < 0,05$) la PA sistólica, diastólica y media desde las 2 hasta las 10 horas post-administración en comparación con el grupo control (Tabla 4.26). La máxima disminución de la PA sistólica fue de 8% y se presentó 10 horas después de la ingestión de aceitunas. Además, la mayor reducción de la PA diastólica y media se observó a las 8 horas post-administración y fue de 11% y 10%, respectivamente.

4.3.2. Efecto de la ingesta diaria de aceitunas de mesa durante 49 días

4.3.2.1. Peso corporal

El efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg sobre el peso corporal, se evaluó en ratas WKY y SHR diariamente durante 49 días. Los valores iniciales fueron $274 \pm 7,48$ g ($n = 6$) en el grupo WKY control y $272 \pm 4,95$ g ($n = 7$) en el grupo WKY aceitunas. Con respecto a los animales SHR, el peso corporal inicial fue de $270 \pm 5,40$ g ($n = 7$) y de $274 \pm 6,44$ g ($n = 8$) en el grupo control y aceitunas, respectivamente. Después de 49 días, las ratas WKY control pesaron $346 \pm 11,8$ g ($n = 6$) y las ratas WKY aceitunas $347 \pm 6,87$ g ($n = 7$); mientras que las SHR pesaron $322 \pm 6,14$ g ($n = 7$) y $326 \pm 7,98$ g ($n = 8$) en el grupo control y aceitunas, respectivamente. Durante todo el experimento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo tratado con aceitunas de cada cepa (Figura 4.30).

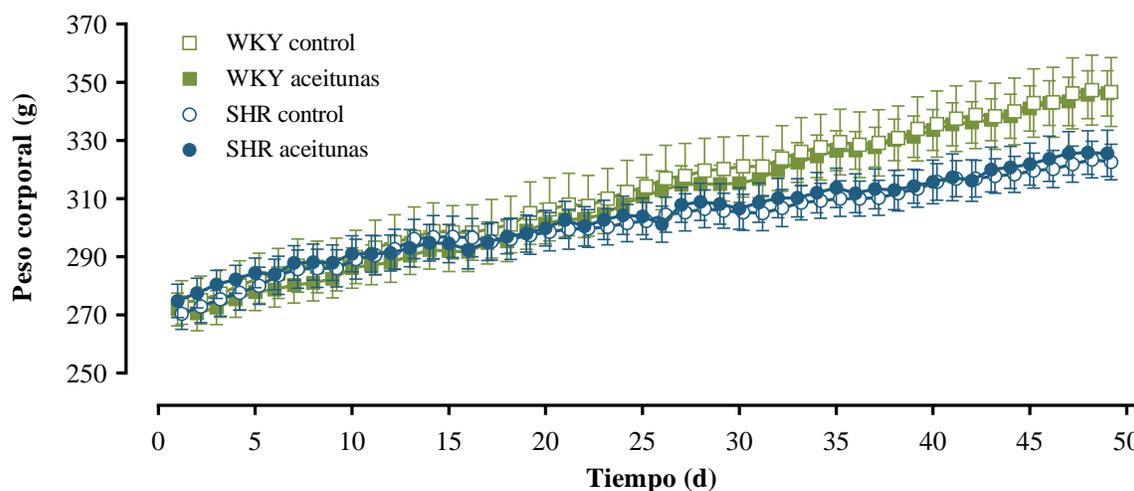


Figura 4.30. Evolución del peso corporal de ratas normotensas (WKY) e hipertensas (SHR) durante los 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de la media de los grupos WKY control ($n = 6$), WKY aceitunas ($n = 7$), SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student.

Por otra parte, la ganancia de peso durante las 7 semanas del estudio crónico fue calculada, siendo de 72 ± 6 g en el grupo WKY control (1,47 g/día), de 75 ± 3 g en el grupo WKY aceitunas (1,53 g/día),

Resultados

de 52 ± 4 g en el grupo SHR control (1,06 g/día) y de 52 ± 6 g en el grupo SHR aceitunas (1,06 g/día) (Tabla 4.27). Al final del experimento, la ganancia de peso de las ratas hipertensas del grupo control fue 28% menor que la presentada por las ratas normotensas del grupo control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas cuando se aplicó una *t* de Student ($p < 0,05$).

Tabla 4.27. Peso corporal de las ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal.

	WKY control (g)	WKY aceitunas (g)	<i>p</i> *	SHR control (g)	SHR aceitunas (g)	<i>p</i> *
1 día	274 ± 7,48	272 ± 5,69	0,821	270 ± 5,40	275 ± 5,80	0,564
7 días	287 ± 9,16	280 ± 6,23	0,567	285 ± 6,62	288 ± 5,94	0,789
14 días	299 ± 9,73	292 ± 6,57	0,598	296 ± 7,42	295 ± 6,28	0,874
21 días	308 ± 10,8	303 ± 6,08	0,694	299 ± 6,88	303 ± 6,39	0,710
28 días	319 ± 11,1	315 ± 6,26	0,730	306 ± 6,49	309 ± 6,43	0,771
35 días	329 ± 11,3	326 ± 6,85	0,834	310 ± 6,10	314 ± 6,75	0,668
42 días	339 ± 11,6	336 ± 7,18	0,861	317 ± 6,35	316 ± 7,17	0,967
49 días	346 ± 11,8	346 ± 7,78	0,989	322 ± 6,14	326 ± 7,98	0,750

WKY, ratas Wistar Kyoto; SHR, spontaneously hypertensive rats. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos WKY control ($n = 6$), WKY aceitunas ($n = 7$), SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante la prueba *t* de Student. * comparado con el grupo control de la misma cepa en el mismo tiempo observado.

4.3.2.2. Ingesta de agua

El efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal sobre el consumo de agua, se evaluó en ratas WKY y SHR cada semana durante 49 días. Durante todo el experimento, la ingestión de agua permaneció estable, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con el consumo de agua presentado al inicio del ensayo. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la ingesta de agua cuando se comparó el grupo control con el grupo tratado con aceitunas de cada cepa. Así, la ingesta promedio diaria presentada por cada rata durante todo el experimento fue de $24,6 \pm 0,3$ ml/día ($n = 5$) en el grupo WKY control y de $25,5 \pm 0,4$ ml/día ($n = 8$) en el grupo WKY aceitunas; mientras que en los grupos SHR control y SHR aceitunas la ingesta promedio diaria de agua fue de $36,5 \pm 0,6$ ml/día ($n = 7$) y $37,5 \pm 0,6$ ml/día ($n = 7$), respectivamente (Tabla 4.28). Cabe destacar, que la ingesta de agua en las ratas hipertensas fue 33% superior a los animales normotensos, presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,001$).

Tabla 4.28. Ingesta de agua de las ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días del consumo diario de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal.

	WKY control (ml/día)	WKY aceitunas (ml/día)	<i>p</i> *	SHR control (ml/día)	SHR aceitunas (ml/día)	<i>p</i> *
7 días	24,3 ± 0,1	24,5 ± 1,7	0,611	37,6 ± 2,8	38,6 ± 2,5	0,588
14 días	25,8 ± 0,6	26,3 ± 0,8	0,655	35,3 ± 1,0	36,7 ± 0,9	0,512
21 días	25,2 ± 0,2	26,4 ± 0,5	0,402	36,8 ± 0,6	39,1 ± 0,1	0,292
28 días	25,6 ± 0,5	27,0 ± 0,9	0,215	36,2 ± 1,7	37,0 ± 0,5	0,750
35 días	23,9 ± 0,4	25,2 ± 0,2	0,367	39,8 ± 1,2	40,2 ± 2,0	0,798
42 días	24,0 ± 0,5	25,0 ± 0,7	0,348	34,3 ± 1,3	35,1 ± 0,4	0,647
49 días	21,7 ± 0,5	21,8 ± 0,2	0,508	34,8 ± 0,5	35,5 ± 0,5	0,906

WKY, ratas Wistar Kyoto; SHR, spontaneously hypertensive rats. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos WKY control ($n = 5$), WKY aceitunas ($n = 8$), SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 7$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. * comparado con el grupo control de la misma cepa en el mismo tiempo observado.

4.3.2.3. Ingesta de alimento

Durante los 49 días del estudio, se calculó el consumo de alimento semanal de las ratas WKY y SHR con el objetivo de evaluar el efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal. A lo largo de las 7 semanas, la ingestión de alimento no mostró diferencias estadísticamente significativas con el consumo presentado al inicio del experimento. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la ingesta de alimento entre el grupo control y el grupo aceitunas de cada cepa (Tabla 4.29).

Tabla 4.29. Ingesta de pienso de las ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días del consumo diario de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal.

	WKY control (g/día)	WKY aceitunas (g/día)	<i>p</i> *	SHR control (g/día)	SHR aceitunas (g/día)	<i>p</i> *
7 días	17,9 ± 0,5	18,1 ± 0,5	0,582	18,2 ± 0,3	18,1 ± 0,1	0,677
14 días	18,2 ± 0,2	17,7 ± 0,4	0,178	18,0 ± 0,2	17,6 ± 0,1	0,230
21 días	18,5 ± 0,1	18,2 ± 0,2	0,568	18,1 ± 0,3	17,8 ± 0,2	0,391
28 días	18,3 ± 0,1	18,1 ± 0,2	0,866	17,7 ± 0,4	17,8 ± 0,2	0,686
35 días	17,7 ± 0,2	17,5 ± 0,4	0,646	17,7 ± 0,1	17,4 ± 0,2	0,327
42 días	17,9 ± 0,1	17,8 ± 0,2	0,819	17,5 ± 0,1	17,4 ± 0,3	0,728
49 días	18,1 ± 0,3	17,9 ± 0,4	0,759	17,4 ± 0,2	17,6 ± 0,4	0,477

WKY, ratas Wistar Kyoto; SHR, spontaneously hypertensive rats. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos WKY control ($n = 5$), WKY aceitunas ($n = 8$), SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 7$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. * comparado con el grupo control de la misma cepa en el mismo tiempo observado.

Resultados

Cuando se calculó el consumo de alimento promedio presentado por cada rata durante los 49 días del estudio los resultados fueron: $18,1 \pm 0,1$ g/día ($n = 5$) en las ratas WKY control, $17,9 \pm 0,1$ g/día ($n = 8$) en las ratas WKY aceitunas, $17,8 \pm 0,1$ g/día ($n = 7$) en las SHR control y $17,7 \pm 0,1$ g/día ($n = 7$) en las SHR que consumieron aceitunas.

4.3.2.4. Eficiencia de conversión alimenticia

La eficiencia de conversión alimenticia de las ratas WKY y SHR fue obtenida a partir del aumento de peso corporal semanal de cada rata dividido por el consumo de alimento semanal durante las 7 semanas del experimento. Durante los 49 días, la eficiencia de conversión alimenticia no mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con el valor determinado al inicio del ensayo. Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de conversión alimenticia entre los grupos control y aceitunas de cada cepa. A lo largo de las 7 semanas, la eficiencia de conversión alimenticia presentada por cada rata fue de $8,7 \pm 0,5\%$ ($n = 5$) en el grupo WKY control, $8,5 \pm 0,3\%$ ($n = 8$) en el grupo WKY aceitunas, $6,2 \pm 0,4\%$ ($n = 7$) en el grupo SHR control y $6,2 \pm 0,4\%$ ($n = 7$) en el grupo SHR aceitunas (Tabla 4.30). Por último, la eficiencia de conversión alimenticia de las ratas hipertensas fue 29% inferior que la de los animales normotensos, presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,01$).

Tabla 4.30. Eficiencia de conversión alimenticia en ratas normotensas e hipertensas durante los 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal.

	WKY control (%)	WKY aceitunas (%)	p^*	SHR control (%)	SHR aceitunas (%)	p^*
7 días	$7,99 \pm 1,7$	$7,39 \pm 0,4$	0,685	$7,85 \pm 1,0$	$7,51 \pm 1,3$	0,899
14 días	$10,2 \pm 1,6$	$9,14 \pm 1,3$	0,499	$7,93 \pm 1,1$	$7,04 \pm 1,5$	0,585
21 días	$9,07 \pm 1,5$	$8,81 \pm 1,0$	0,892	$5,49 \pm 0,8$	$6,53 \pm 1,1$	0,647
28 días	$10,4 \pm 0,2$	$9,67 \pm 0,4$	0,743	$5,60 \pm 1,1$	$6,76 \pm 1,1$	0,471
35 días	$8,37 \pm 0,2$	$9,58 \pm 0,8$	0,413	$4,86 \pm 0,9$	$4,95 \pm 0,5$	0,867
42 días	$8,80 \pm 0,3$	$7,72 \pm 0,9$	0,483	$5,43 \pm 0,7$	$6,67 \pm 0,7$	0,451
49 días	$6,44 \pm 0,6$	$7,43 \pm 0,9$	0,493	$4,79 \pm 0,5$	$4,79 \pm 1,2$	0,909

WKY, ratas Wistar Kyoto; SHR, spontaneously hypertensive rats. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de los grupos WKY control ($n = 5$), WKY aceitunas ($n = 8$), SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 7$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. comparado con el grupo control de la misma cepa en el mismo tiempo observado.

4.3.2.5. Presión arterial en ratas normotensas

Al inicio del ensayo, la PA sistólica, diastólica y media fue similar entre las ratas normotensas del grupo control ($n = 5$) como en las asignadas al grupo de tratamiento con aceitunas ($n = 8$). Posteriormente, y

durante los 49 días del estudio crónico, la PA de las ratas normotensas de ambos grupos se mantuvo estable. De esta manera, no se encontraron diferencias significativas tanto en el grupo WKY control como en el grupo WKY aceitunas, cuando se compararon los valores de PA basales de cada grupo con los presentados en cada una de las semanas (Figura 4.31).

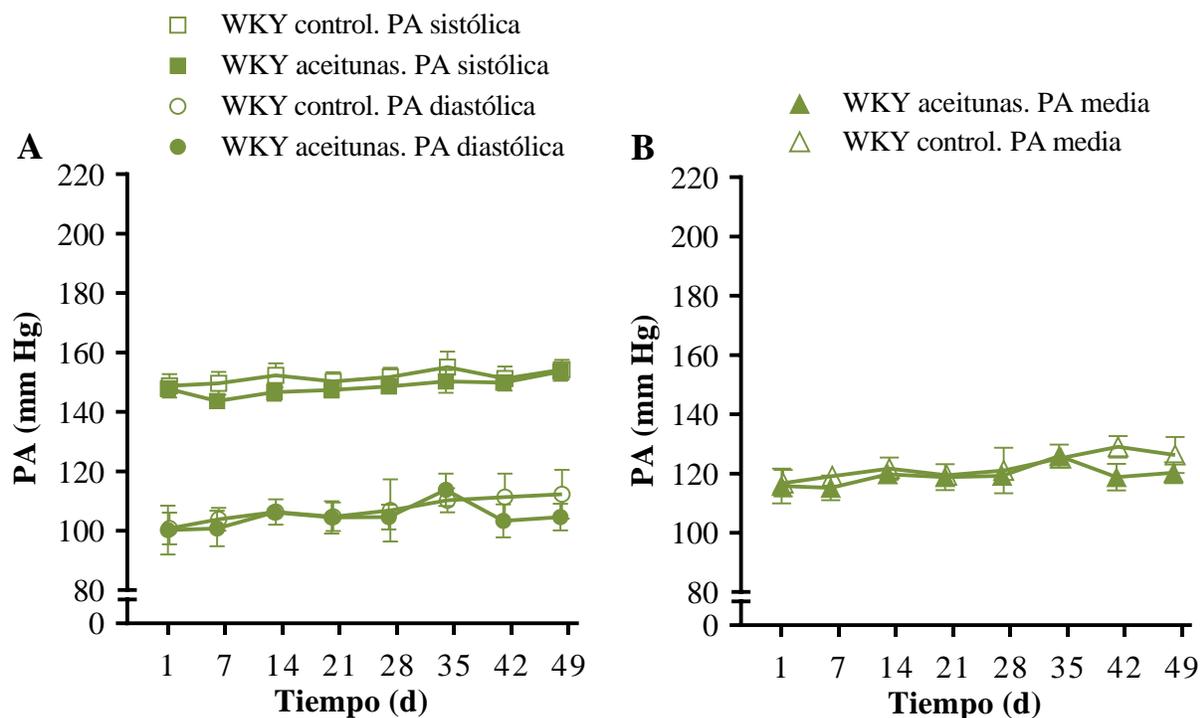


Figura 4.31. Presión arterial (PA) en ratas normotensas (WKY) de 14 semanas de edad después de la ingestión diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal. El gráfico muestra los valores de PA sistólica, diastólica (A) y media (B) durante 49 días. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media del grupo WKY control ($n = 5$) y el grupo WKY aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer.

La PA sistólica, diastólica y media de las ratas normotensas que fueron administradas con agua y las ratas normotensas que fueron administradas con aceitunas de mesa Arbequina no fueron estadísticamente diferentes durante las 7 semanas del estudio crónico. No obstante, una mínima disminución sin significancia estadística del 4% de la PA sistólica pudo observarse a los 7 y 14 días de la administración de aceitunas. Respecto a la PA diastólica y media, el mayor decremento se encontró a los 42 días y fue del 7% y el 8%, respectivamente (Tabla 4.31).

Resultados

Tabla 4.31. Efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal durante 49 días sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas normotensas de 14 semanas de edad.

	PA sistólica (mm Hg)				PA diastólica (mm Hg)				PA media (mm Hg)			
	WKY control	WKY aceitunas	Δ	p^*	WKY control	WKY aceitunas	Δ	p^*	WKY control	WKY aceitunas	Δ	p^*
0 d	148,5 ± 4,0	147,8 ± 2,5	-1	0,879	100,5 ± 5,4	100,3 ± 8,3	0	0,982	116,5 ± 4,5	115,8 ± 5,9	-1	0,909
7d	149,3 ± 3,8	143,7 ± 2,2	-6	0,233	103,5 ± 3,9	100,8 ± 6,0	-3	0,742	118,8 ± 2,6	115,1 ± 4,3	-4	0,540
14 d	152,0 ± 4,1	146,7 ± 2,9	-5	0,258	106,0 ± 4,3	106,2 ± 1,8	0	0,983	121,4 ± 3,7	119,7 ± 1,7	-2	0,783
21 d	149,9 ± 3,1	147,4 ± 2,6	-3	0,595	104,4 ± 4,8	104,4 ± 5,5	0	0,993	119,2 ± 3,1	118,8 ± 4,4	0	0,947
28 d	151,5 ± 3,1	148,6 ± 2,5	-3	0,541	106,6 ± 10	104,6 ± 4,2	-2	0,824	120,7 ± 7,7	119,3 ± 2,8	-1	0,822
35 d	154,8 ± 5,3	150,2 ± 3,9	-5	0,332	110,0 ± 4,1	113,8 ± 5,5	+4	0,648	124,9 ± 3,2	125,9 ± 3,9	+1	0,870
42 d	151,0 ± 4,1	149,9 ± 2,4	-1	0,903	111,1 ± 8,0	103,3 ± 5,6	-8	0,364	128,8 ± 3,7	118,8 ± 4,5	-10	0,134
49 d	153,9 ± 3,3	153,6 ± 3,1	0	0,947	111,9 ± 8,3	104,6 ± 4,4	-7	0,389	125,9 ± 6,1	120,2 ± 3,6	-6	0,360

PA, presión arterial; d, días post-administración; WKY, ratas Wistar Kyoto. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos WKY control ($n = 5$) y WKY aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. * comparado con el grupo control en el mismo tiempo observado.

4.3.2.6. Presión arterial en ratas hipertensas

Los valores basales de la PA sistólica, diastólica y media de las ratas hipertensas del grupo control ($n = 7$) y de las ratas asignadas al grupo de tratamiento con aceitunas Arbequina ($n = 8$) fueron semejantes. Posteriormente, y durante las 7 semanas del estudio crónico, la PA de las ratas hipertensas del grupo control se mantuvo estable. Por otra parte, las ratas que consumieron aceitunas disminuyeron su PA cuando se compararon sus valores basales con los presentados a lo largo del experimento. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se encontraron a los 21 días en la PA sistólica (5%), a los 28 días en la PA diastólica (7%) y a los 21 y 28 días en la PA media con 6% para ambos días (Figura 4.32).

Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) también se encontraron cuando se comparó la PA de las ratas administradas con aceitunas respecto al grupo control. Así, la administración oral de aceitunas de mesa Arbequina disminuyó la PA sistólica, diastólica y media desde los 14 días hasta los 49 días del estudio (Tabla 4.32). La máxima disminución de la PA sistólica fue de 8% y se presentó a los 21 días de la ingestión diaria de aceitunas. La mayor reducción de la PA diastólica se observó a los 35 días y fue del 9%, mientras que el decremento más notable de la PA media se encontró a los 28 días y también fue del 9%.

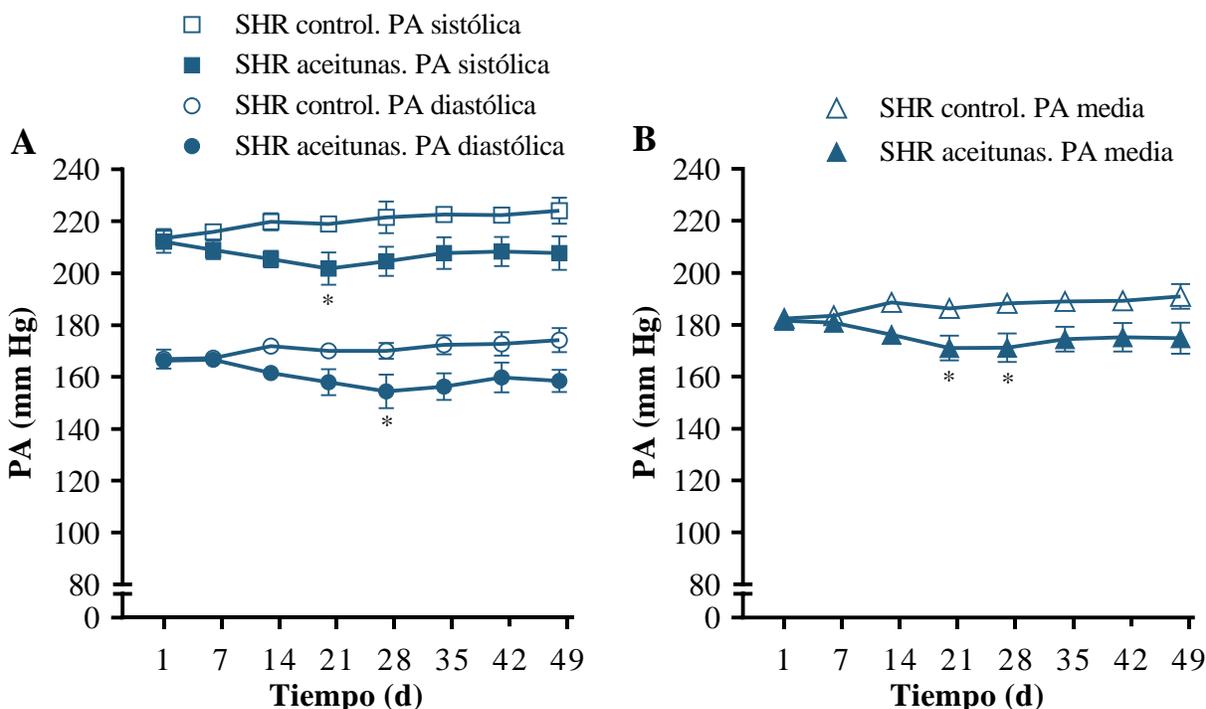


Figura 4.32. Presión arterial (PA) en ratas hipertensas (SHR) de 14 semanas de edad después de la ingestión diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal. El gráfico muestra los valores de PA sistólica, diastólica (A) y media (B) durante 49 días. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media del grupo SHR control ($n = 7$) y el grupo SHR aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: $*p < 0,05$ comparado con el valor del tiempo 0 h del mismo grupo.

Tabla 4.32. Efecto de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal durante 49 días sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media de ratas hipertensas de 14 semanas de edad.

	PA sistólica (mm Hg)				PA diastólica (mm Hg)				PA media (mm Hg)			
	SHR control	SHR aceitunas	Δ	p^*	SHR control	SHR aceitunas	Δ	p^*	SHR control	SHR aceitunas	Δ	p^*
0 d	213,5 ± 3,5	212,1 ± 4,3	-1	0,839	166,9 ± 3,7	166,2 ± 2,7	-1	0,905	182,4 ± 3,2	181,5 ± 2,8	-1	0,862
7d	216,0 ± 1,6	209,0 ± 3,6	-7	0,324	167,2 ± 1,4	166,6 ± 2,2	-1	0,911	183,5 ± 1,4	180,8 ± 2,2	-3	0,605
14 d	219,8 ± 3,4	205,4 ± 3,3	-14	0,022	171,8 ± 2,2	161,5 ± 1,9	-10	0,049	188,6 ± 1,7	176,1 ± 1,9	-13	0,012
21 d	218,9 ± 2,8	201,8 ± 6,2	-17	0,007	170,0 ± 1,2	158,0 ± 5,0	-12	0,034	186,3 ± 0,9	171,1 ± 4,7	-15	0,004
28 d	221,5 ± 6,1	204,5 ± 5,6	-17	0,026	170,0 ± 3,1	154,4 ± 6,5	-16	0,005	188,2 ± 3,4	171,1 ± 5,5	-17	0,002
35 d	222,6 ± 2,3	207,7 ± 6,2	-15	0,022	172,4 ± 3,7	156,3 ± 5,1	-16	0,004	189,0 ± 3,0	174,4 ± 4,7	-15	0,004
42 d	222,4 ± 3,0	208,4 ± 5,6	-14	0,031	172,7 ± 4,6	159,9 ± 5,8	-13	0,036	189,3 ± 3,6	175,2 ± 5,6	-14	0,020
49 d	224,1 ± 5,0	207,8 ± 6,6	-16	0,033	174,2 ± 4,7	158,5 ± 4,2	-16	0,008	190,9 ± 4,8	174,8 ± 6,0	-16	0,007

PA, presión arterial; d, días post-administración; SHR, spontaneously hypertensive rats. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 8$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. * comparado con el grupo control en el mismo tiempo observado.

Resultados

4.3.2.7. Necropsia

La evaluación *post mortem* se realizó al final de los 49 días del estudio crónico. No se encontraron diferencias a nivel macroscópico en el color o textura de los órganos y los depósitos de grasa extraídos entre los diferentes grupos de estudio. Además, los pesos relativos finales (mg/g de peso corporal) del riñón, hígado, corazón, bazo y pulmones, así como los depósitos de grasa de los animales, no fueron afectados por la administración oral diaria de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal en comparación con el grupo de control de cada cepa (Tabla 4.33). No obstante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos relativos de los órganos de las cepas WKY y SHR. El hígado, el corazón y el bazo de las ratas hipertensas del grupo control fueron un 25%, 26% y 15% más grandes en comparación con las ratas normotensas del grupo control ($p < 0,001$). Además, el peso relativo de la almohadilla epididimaria izquierda fue 46% menor en el grupo SHR control en comparación con el grupo WKY control ($p < 0,05$).

Tabla 4.33. Pesos relativos de los órganos y depósitos de grasa de ratas normotensas e hipertensas después de 49 días de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas Arbequina deshuesadas por kg de peso corporal.

Órganos (mg/g de peso corporal)	WKY control	WKY aceitunas	P^*	SHR control	SHR aceitunas	P^*
Riñones	5,79 ± 0,06	5,51 ± 0,09	0,057	5,53 ± 0,08	5,70 ± 0,14	0,304
Hígado	27,2 ± 0,46	26,2 ± 0,38	0,128	33,9 ± 0,38	32,9 ± 1,07	0,427
Corazón	3,69 ± 0,12	3,63 ± 0,13	0,755	4,65 ± 0,03	4,70 ± 0,25	0,889
Bazo	1,71 ± 0,02	1,67 ± 0,02	0,283	1,95 ± 0,04	1,91 ± 0,04	0,496
Pulmones	3,57 ± 0,04	3,35 ± 0,14	0,301	3,78 ± 0,17	3,93 ± 0,19	0,583
Depósito omental	3,70 ± 0,28	4,08 ± 0,18	0,250	4,39 ± 0,25	4,30 ± 0,27	0,810
Almohadilla retroperitoneal izquierda	8,52 ± 0,51	9,06 ± 0,53	0,510	8,25 ± 0,21	7,94 ± 0,53	0,627
Almohadilla epididimaria izquierda	4,86 ± 0,54	5,49 ± 0,39	0,356	3,34 ± 0,15	3,60 ± 0,14	0,241

WKY, ratas Wistar Kyoto; SHR, spontaneously hypertensive rats. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos WKY control ($n = 5$), WKY aceitunas ($n = 8$), SHR control ($n = 7$) y SHR aceitunas ($n = 7$). Los datos fueron analizados mediante t de Student. * comparado con el grupo control de la misma cepa.

4.3.3. Determinación de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS

4.3.3.1. Validación del método de análisis conjunto de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS

a) Triterpenos pentacíclicos

Al realizar el experimento, se estableció la precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad por cada nivel de concentración (0, 25, 50, 75 y 100 nM) que se analizaron por triplicado. Como resultado se obtuvo que la precisión intra-ensayo y la exactitud fueron apropiadas, mostrando un porcentaje de variabilidad por debajo del 15% en todos los compuestos. Además, el método analítico presentó linealidad ya que el R^2 de los triterpenos ácidos fue mayor a 0,998, mientras que para el eritrodiol y el uvaol fue de 0,992 y 0,991, respectivamente. Por último, los triterpenos se pueden detectar con sensibilidad, mostrando valores de LOD y LOQ menores a 0,20 nM y 0,33 nM para los triterpenos ácidos. En relación con el eritrodiol y el uvaol, se observaron valores de LOD de 1,47 nM y 5,54 nM y de LOQ de 2,45 nM y 9,23 nM, respectivamente (Tabla 4.34).

Tabla 4.34. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-APCI-MS.

Triterpeno pentacíclico	Precisión CV (%)	Exactitud (%)	Linealidad		Sensibilidad	
			Ecuación	R^2	LOD (nM)	LOQ (nM)
Ácido maslínico	4,99	2,51	$y = 0,00691x + 7,757e^{-7}$	0,999	0,05	0,08
Ácido oleanólico	4,32	3,15	$y = 0,00965x - 5,927e^{-9}$	0,998	0,20	0,33
Ácido ursólico	3,75	1,72	$y = 0,00741x - 0,00182$	0,998	0,11	0,18
Eritrodiol	4,04	1,18	$y = 0,00688x - 0,01221$	0,992	1,47	2,45
Uvaol	5,75	-1,56	$y = 0,00239x + 0,00399$	0,991	5,54	9,23

CV, coeficiente de variación; y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los triterpenos (nM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de la precisión, exactitud y sensibilidad son expresados como las medias de todos los niveles de concentración evaluados.

b) Polifenoles

Para verificar que el análisis de los polifenoles en el plasma de los animales se realizaba de forma correcta, se estableció la precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método en las concentraciones de 0, 2,5, 5, 10, 15, 20 y 25 nM, que se analizaron por triplicado. Los resultados mostraron precisión intra-ensayo y exactitud satisfactorias ya que el CV estuvo por debajo del 15%.

Resultados

También se puede observar linealidad ya que el R^2 de todos los polifenoles fue mayor a 0,995. De los 16 polifenoles analizados en este experimento, 10 mostraron valores muy bajos de LOD que oscilaron entre 0,17 nM y 0,90 nM y consecuentemente sus valores de LOQ estuvieron entre 0,28 nM y 1,51 nM. Por otra parte, se observaron valores de LOD más altos para el pinosresinol, salidroside, ácido cafeico, ácido vanílico, tirosol y ácido *p*-cumárico que fueron de 1,87 nM a 7,96 nM y consiguientemente valores más altos de LOQ que fueron de 3,12 nM a 13,2 nM. Por último, en las curvas de calibración no se detectó catecol ni hidroxitirosol acetato debido a que el LOQ de ambos compuestos estaba por encima de los 25 nM (Tabla 4.35).

Tabla 4.35. Precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad del método para determinar polifenoles en plasma de ratas WKY y SHR por LC-ESI-MS/MS.

Polifenol	Precisión CV (%)	Exactitud (%)	Linealidad		Sensibilidad	
			Ecuación	R^2	LOD (nM)	LOQ (nM)
Apigenina	3,27	-3,16	$y = 0,00169x + 2,276e^{-4}$	0,997	0,90	1,51
Ácido cafeico	3,42	-1,13	$y = 0,00267x + 2,703e^{-4}$	0,998	3,93	6,55
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,92	-1,01	$y = 0,00030x + 6,895e^{-6}$	0,996	7,96	13,2
Ácido vanílico	2,92	0,75	$y = 0,00057x - 8,098e^{-6}$	0,998	5,41	9,02
Hidroxitirosol	3,64	-3,71	$y = 0,00231x - 1,431e^{-4}$	0,995	0,61	1,02
Luteolina	4,19	-1,49	$y = 0,00525x + 5,826e^{-8}$	0,995	0,17	0,28
Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido	3,93	1,71	$y = 0,00725x + 2,202e^{-4}$	0,997	0,24	0,41
Oleuropeína	5,35	-0,68	$y = 0,00135x + 4,809e^{-4}$	0,997	0,40	0,66
(+)-Pinosresinol	3,83	0,08	$y = 0,00124x - 1,952e^{-4}$	0,997	1,87	3,12
Quercetina	4,14	-1,04	$y = 0,00163x + 4,111e^{-4}$	0,997	0,65	1,08
Rutina	3,67	-3,72	$y = 0,00071x + 3,658e^{-4}$	0,996	0,29	0,48
Salidroside	5,97	-0,32	$y = 0,00034x - 5,105e^{-5}$	0,995	2,75	4,58
Tirosol	5,51	2,68	$y = 7,359e^{-5}x - 1,956e^{-5}$	0,999	7,75	12,9
Verbascósido	4,70	-1,09	$y = 0,00095x + 2,316e^{-4}$	0,998	0,69	1,14

CV, coeficiente de variación; y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los polifenoles (nM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de la precisión, exactitud y sensibilidad son expresados como las medias de todos los niveles de concentración evaluados.

4.3.3.2. Identificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS

En el plasma de las ratas de ambas cepas asignadas al grupo control no se detectó la presencia de ningún triterpeno pentacíclico. Por otra parte, se identificó ácido maslínico y el ácido oleanólico después de la administración de 3,85 g de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal por 49 días en el

plasma de las ratas asignadas a los grupos WKY aceitunas ($n = 4$) y SHR aceitunas ($n = 4$). Además, no se detectó la presencia de ácido ursólico, eritrodíol o uvaol en estos animales (Figura 4.33).

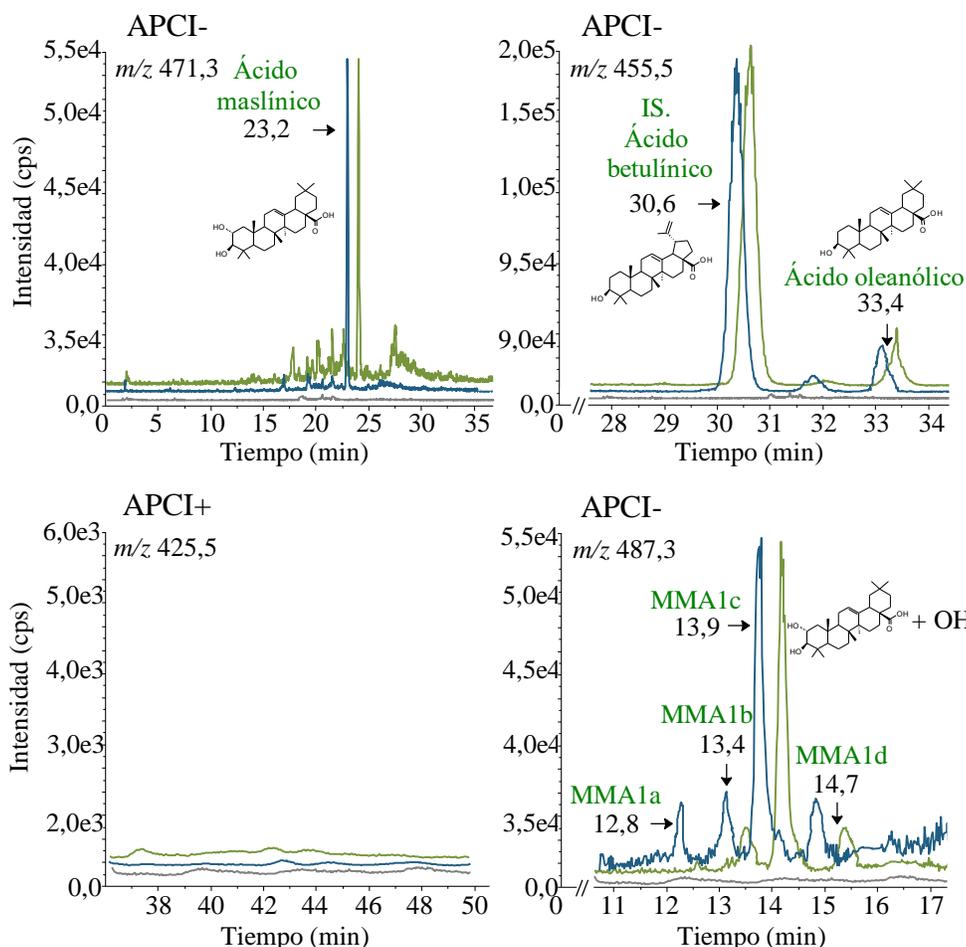


Figura 4.33. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos encontrados en el plasma de los animales después del consumo diario de 3,85 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal. Se representan los grupos WKY aceitunas (línea verde) y SHR aceitunas (línea azul). La línea gris indica el XIC en el plasma blanco.

A partir de la identificación del ácido maslínico y el ácido oleanólico en el plasma de las ratas WKY y SHR, se buscaron sus metabolitos de fase I y II siguiendo los parámetros de espectrometría de los compuestos padre. Además, se comprobó la presencia de los metabolitos comparando sus XIC con los presentados en el plasma de rata blanco. Así, se detectaron pequeñas cantidades de cuatro metabolitos de fase I del ácido maslínico que corresponden a la monohidroxilación de este compuesto: MMA1a, MMA1b, MMA1c y MMA1d. No se detectaron metabolitos del ácido oleanólico. Los cromatogramas representativos de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos encontrados en el plasma de los animales pueden observarse en la figura 4.33.

Resultados

4.3.3.3. Identificación de polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR por LC-MS

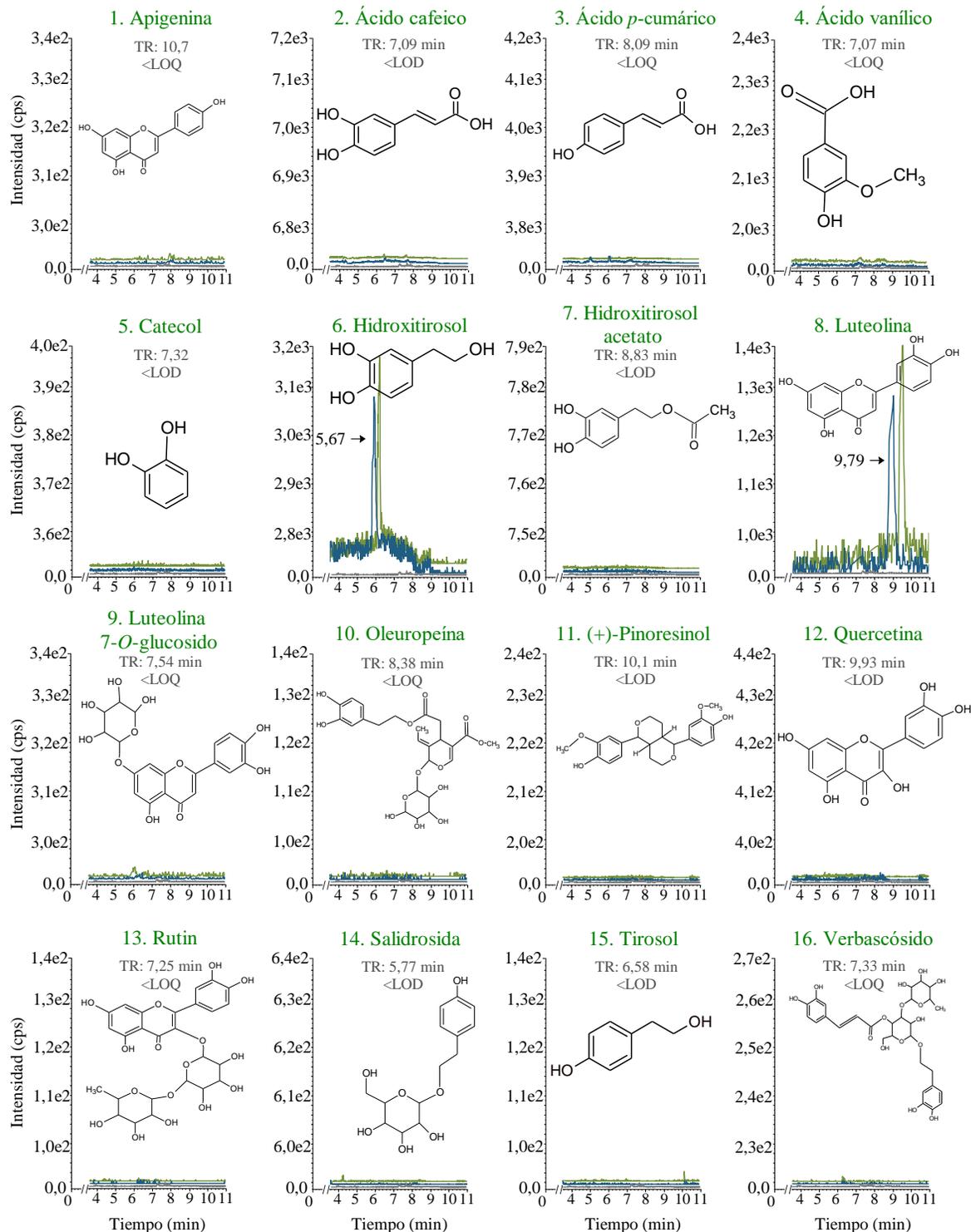


Figura 4.34. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-ESI-MS/MS de los polifenoles encontrados en el plasma de los animales después del consumo diario de 3,85 g de aceitunas deshuesadas/kg de peso corporal. Se representan los grupos WKY aceitunas (línea verde) y SHR aceitunas (línea azul). La línea gris indica el XIC en el plasma blanco. Tiempo de retención (TR), menor al límite de detección (<LOD), menor al límite de cuantificación (<LOQ).

En el plasma de las ratas de ambas cepas asignadas al grupo control no se detectó la presencia de ningún polifenol. Por otra parte, en las ratas asignadas a los grupos WKY aceitunas ($n = 4$) y SHR aceitunas ($n = 4$), se detectó la presencia de hidroxitirosol y luteolina en plasma después de la administración de 3,85 g de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal por 49 días. Por último, y siguiendo los parámetros de espectrometría de los compuestos padre, se examinó la presencia de los metabolitos del hidroxitirosol, luteolina y tirosol en el plasma de ratas WKY y SHR sin detectarse ninguno de ellos. En la figura 4.34 se muestran los cromatogramas obtenidos por LC-ESI-MS/MS de los polifenoles en plasma de los animales.

4.3.3.4. Concentración de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos en plasma de ratas WKY y SHR

Después de 49 días de experimento, se cuantificaron los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles en el plasma de las ratas normotensas e hipertensas de los grupos control y aceitunas entre las 15 y 17 horas posteriores a la última administración oral de 3,85 g de aceitunas/kg de peso corporal o agua. El compuesto encontrado en mayor cantidad fue el ácido maslínico, con concentraciones de $3,13 \pm 0,85$ nM en el grupo WKY aceitunas y $3,51 \pm 1,10$ nM en el grupo SHR aceitunas. El ácido oleanólico se encontró a $1,08 \pm 0,19$ nM y $1,34 \pm 0,40$ nM en el plasma de los grupos WKY aceitunas y SHR aceitunas, respectivamente. Por otra parte, el hidroxitirosol y la luteolina en plasma se encontraron en concentraciones menores a 1 nM (Tabla 4.36).

Tabla 4.36. Concentración plasmática de triterpenos pentacíclicos, polifenoles y sus metabolitos después de la ingesta diaria de 3,85 g de aceitunas Arbequina deshuesadas/kg de peso corporal durante 49 días en ratas normotensas y ratas hipertensas.

Compuesto	WKY control (nM)	WKY aceitunas (nM)	SHR control (nM)	SHR aceitunas (nM)
Triterpenos pentacíclicos				
Ácido maslínico	ND	$3,13 \pm 0,85$	ND	$3,51 \pm 1,10$
MMA1a	ND	ND	ND	$0,27 \pm 0,07$
MMA1b	ND	0,47	ND	$0,19 \pm 0,03$
MMA1c	ND	$1,51 \pm 0,25$	ND	$1,64 \pm 0,13$
MMA1d	ND	$0,44 \pm 0,24$	ND	$0,35 \pm 0,05$
Ácido oleanólico	ND	$1,08 \pm 0,19$	ND	$1,34 \pm 0,40$
Polifenoles				
Hidroxitirosol	ND	$0,50 \pm 0,20$	ND	$0,48 \pm 0,14$
Luteolina	ND	$0,42 \pm 0,02$	ND	$0,12 \pm 0,02$

WKY, ratas Wistar Kyoto; SHR, spontaneously hypertensive rats; ND, No detectado. Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media.

Resultados

Los metabolitos del ácido maslínico, se encontraron a concentraciones totales de 2,42 nM y 2,45 nM en las ratas normotensas e hipertensas administradas con aceitunas. Concretamente, el metabolito MMA1a no se encontró en ratas WKY aceitunas, mientras que se detectó a $0,27 \pm 0,07$ nM en los animales SHR aceitunas. El MMA1b se encontró en solo en una rata del grupo WKY aceitunas a 0,47 nM y en dos ratas del grupo SHR aceitunas a $0,19 \pm 0,03$ nM. El metabolito más abundante, el MMA1c, alcanzó la concentración de $1,51 \pm 0,25$ nM y $1,64 \pm 0,13$ nM en los grupos WKY aceitunas y SHR aceitunas, respectivamente. Finalmente, el metabolito MMA1d se encontró a una concentración de $0,44 \pm 0,24$ nM en las ratas normotensas y a $0,35 \pm 0,05$ nM en las ratas hipertensas (Tabla 4.36).

4.4. Capítulo IV. Intervención nutricional: concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en voluntarios sanos después del consumo de aceitunas de la variedad Arbequina

4.4.1. Fase 1. Estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después de la ingesta de una dosis única de aceitunas Arbequina en sujetos sanos

4.4.1.1. Características de los participantes

En esta etapa del ensayo clínico, se estudió la farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos en hombres sanos que consumieron 60 y 120 aceitunas de mesa de la variedad Arbequina. Los 18 varones sanos seleccionados del panel de voluntarios recibieron las dos dosis de aceitunas Arbequina de forma aleatoria teniendo un periodo de lavado de 7 días entre dosis. Antes de iniciar la intervención con aceitunas, se evaluaron las características de los participantes obteniendo los resultados descritos en la tabla 4.37. Todos los voluntarios presentaron buena salud y ningún trastorno metabólico durante todo el estudio y no se informaron efectos adversos derivados de la ingesta de aceitunas.

Tabla 4.37. Características de los participantes antes de iniciar la intervención con 60 o 120 aceitunas de mesa.

Variable	Resultado	Variable	Resultado
Características generales		ALT (U/l)	23,7 ± 3,10
Edad (años)	23,7 ± 0,63	Fosfatasa alcalina (U/l)	71,2 ± 4,45
Peso (kg)	73,3 ± 2,02	Proteínas totales (g/l)	70,1 ± 0,94
Estatura (cm)	179 ± 1,96	Perfil lipídico	
IMC (kg/m ²)	23,4 ± 0,40	Triglicéridos (mM)	0,74 ± 0,06
Circunferencia abdominal (cm)	86,1 ± 1,45	Colesterol total (mM)	4,11 ± 0,16
Pruebas analíticas		Colesterol HDL (mM)	1,36 ± 0,04
Sodio (mEq/l)	141 ± 0,33	Colesterol LDL (mM)	2,40 ± 0,15
Glucosa (mM)	4,23 ± 0,09	Colesterol VLDL (mM)	0,34 ± 0,03
Úrea (mM)	5,32 ± 0,34	Presión arterial	
Creatinina (mM)	78,9 ± 2,09	Sistólica (mm Hg)	118 ± 1,79
AST (U/l)	24,2 ± 2,25	Diastólica (mm Hg)	61,5 ± 1,39

IMC, índice de masa corporal; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; VLDL, very low density lipoprotein. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media ($n = 18$).

4.4.1.2. Cantidad de triterpenos pentacíclicos consumidos por los participantes

En este ensayo, se utilizaron las aceitunas de la variedad Arbequina de la cosecha 2015-2016 cuyas

Resultados

concentraciones de triterpenos pentacíclicos se describen en el apartado 4.1.2.3. La cantidad de pulpa de aceitunas ingerida por los sujetos se obtuvo por diferencia de pesos. Así, las Arbequinas se pesaron antes de su ingestión y posteriormente los huesos restantes fueron pesados. Los sujetos asignados al grupo de 60 aceitunas consumieron $66 \pm 0,70$ g de pulpa de aceitunas. Por otra parte, los voluntarios asignados al grupo de 120 aceitunas ingirieron $128 \pm 1,33$ g de pulpa de aceitunas. Las cantidades promedio de los triterpenos pentacíclicos ingeridos por los voluntarios se muestran en la tabla 4.38.

Tabla 4.38. Cantidad de triterpenos pentacíclicos consumidos por los sujetos en el estudio farmacocinético.

Compuesto	Dosis de 60 aceitunas		Dosis de 120 aceitunas	
	Cantidad consumida (mg)	Cantidad consumida (μ M)	Cantidad consumida (mg)	Cantidad consumida (μ M)
Ácido maslínico	$155 \pm 1,65$	$328 \pm 3,49$	$299 \pm 3,11$	$633 \pm 6,58$
Ácido oleanólico	$57,1 \pm 0,61$	$125 \pm 1,33$	$110 \pm 1,14$	$241 \pm 2,51$
Eritrodiol	$0,69 \pm 0,01$	$1,56 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,01$	$3,00 \pm 0,03$

Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media.

4.4.1.3. Validación del método de análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS

a) Precisión y exactitud

La precisión y la exactitud fueron determinadas en nueve concentraciones y por triplicado (Tabla 4.39).

La precisión intra-ensayo fue evaluada a las concentraciones entre 5 nM y 500 nM y oscilo entre 0.04% y 12.6% para todos los compuestos (Tabla 4.39). Hay que remarcar la eleva precisión obtenida en la concentración de 5 nM, que se encontró en el rango de 3.83% para el eritrodiol y 10,9% para el ácido ursólico. En este experimento, la variabilidad de todas las concentraciones estuvo por debajo del 15%, cumpliendo con los requisitos establecidos por la EMA (2011)

De igual forma se obtuvieron resultados satisfactorios para la exactitud analizada también entre 5 y 500 nM para los triterpenos pentacíclicos analizados al ser inferior al 15% recomendado por la EMA (2011). Hay que remarcar que incluso en la concentración de 5 nM la exactitud fue inferior al 15% (Tabla 4.39).

Tabla 4.39. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de hombres sanos por LC-APCI-MS.

Compuesto	Precisión intra-ensayo (CV %)								
	5 nM	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM	150nM	200 nM	300 nM	500 nM
Ácido maslínico	3,89	12,6	4,91	7,81	1,82	5,08	0,52	1,79	1,77
Ácido oleanólico	5,08	2,08	0,30	5,57	0,77	1,00	0,96	3,62	3,68
Ácido ursólico	10,9	6,39	3,12	0,46	0,95	3,32	2,78	1,62	2,71
Eritrodiol	3,83	2,17	9,94	0,04	2,22	2,00	3,12	1,86	1,73
Uvaol	10,8	4,80	8,31	10,5	2,32	0,97	2,26	2,58	0,23
Exactitud (%)									
Ácido maslínico	-2,49	-6,19	5,08	-1,26	-9,22	3,28	3,38	2,58	-1,16
Ácido oleanólico	-11,2	-10,2	-14,8	-7,63	0,13	5,49	5,89	-2,87	-0,94
Ácido ursólico	5,14	-5,04	-8,07	0,86	-5,45	-4,04	1,08	1,08	0,04
Eritrodiol	6,68	-1,34	-7,40	-12,0	4,30	7,55	-5,58	1,09	-0,21
Uvaol	-14,4	14,3	-1,00	-6,72	-10,1	3,76	5,39	-3,27	0,41

CV, Coeficiente de variación. Los valores son presentados como media en el intra-ensayo ($n = 3$), y exactitud ($n = 3$).

b) Linealidad y sensibilidad

El método analítico, evaluado en un rango de concentración de 0 a 500 nM, presentó linealidad ya que el R^2 de todos los triterpenos fue mayor a 0,997. Por otra parte, los triterpenos se pueden detectar con sensibilidad, mostrando valores de LOD y LOQ menores a 1,41 nM y 2,35 nM para los triterpenos ácidos. En relación con el eritrodiol y el uvaol, se observaron valores de LOD de 1,52 nM y 3,32 nM y de LOQ de 2,54 nM y 5,53 nM, respectivamente (Tabla 4.40).

Tabla 4.40. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de hombres sanos por LC-APCI-MS.

Triterpeno pentacíclico	Linealidad		Sensibilidad	
	Ecuación	R^2	LOD (nM)	LOQ (nM)
Ácido maslínico	$y = 0,00519x + 3,221e^{-6}$	0,998	0,15	0,25
Ácido oleanólico	$y = 0,00987x - 0,03066$	0,997	0,34	0,57
Ácido ursólico	$y = 0,00774x + 0,09003$	0,999	1,41	2,35
Eritrodiol	$y = 0,00880x + 0,01242$	0,998	1,52	2,54
Uvaol	$y = 0,00315x + 0,01658$	0,998	3,32	5,53

y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los triterpenos (nM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-sígnal 3:1); LOQ, límite de cuantificación (relación ruido-sígnal 5:1). Los resultados de la sensibilidad son expresados como las medias de todos los niveles de concentración evaluados.

Resultados

c) Selectividad

Las muestras de plasma de los sujetos que aún no han consumido las aceitunas se compararon con las muestras de plasma enriquecidas con los analitos a la concentración de 500 nM. De esta manera, se demostró que el procedimiento de extracción de los triterpenos pentacíclicos fue conveniente para diferenciar estos analitos de los compuestos endógenos encontrados en el plasma de los participantes en el estudio (Figura 4.35).

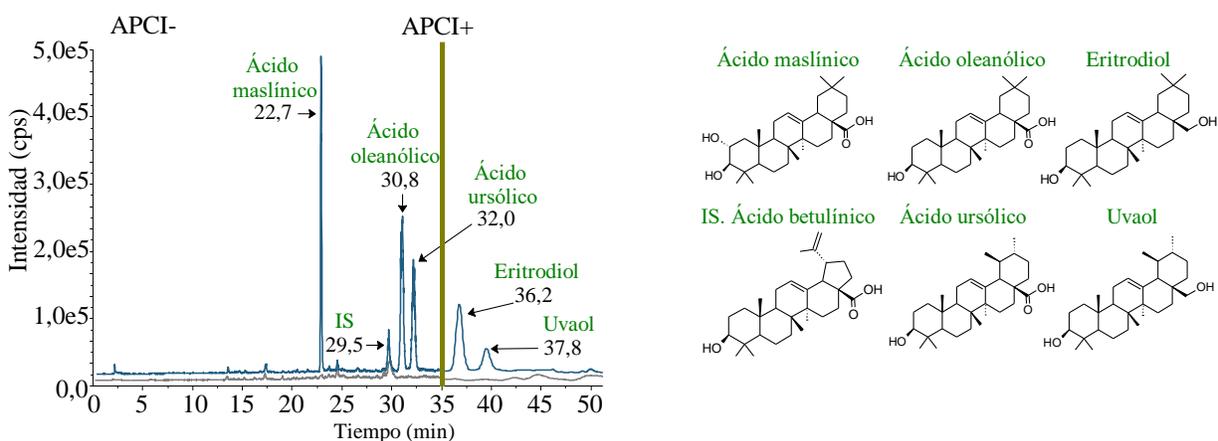


Figura 4.35. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido por LC-APCI-MS del plasma de los sujetos que aún no han consumido las aceitunas (línea gris) y plasma de los sujetos enriquecido con una mezcla de triterpenos pentacíclicos a una concentración de 500 nM (línea azul).

d) Carry over

El *carry over* fue evaluado inyectando secuencialmente el estándar de calibración de la concentración más alta seguido del plasma de los sujetos que no han consumido las aceitunas durante toda la secuencia de inyección.

Como resultado, no se encontraron picos correspondientes a los analitos o al IS en las muestras de plasma analizadas inmediatamente después a los estándares de calibración.

4.4.1.4. Identificación de triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en plasma de hombres sanos por LC-MS

a) Triterpenos pentacíclicos

El ácido maslínico y el ácido oleanólico fueron identificados en el plasma de los participantes después del consumo de 60 y 120 aceitunas Arbequina.

Por otra parte, no se detectó la presencia de ácido ursólico, eritrodíol o uvaol en ningún tiempo analizado en ambos grupos de intervención.

Los cromatogramas representativos de los triterpenos pentacíclicos identificados en el plasma de los sujetos sanos 1 hora después del consumo de las aceitunas, pueden observarse en la figura 4.36.

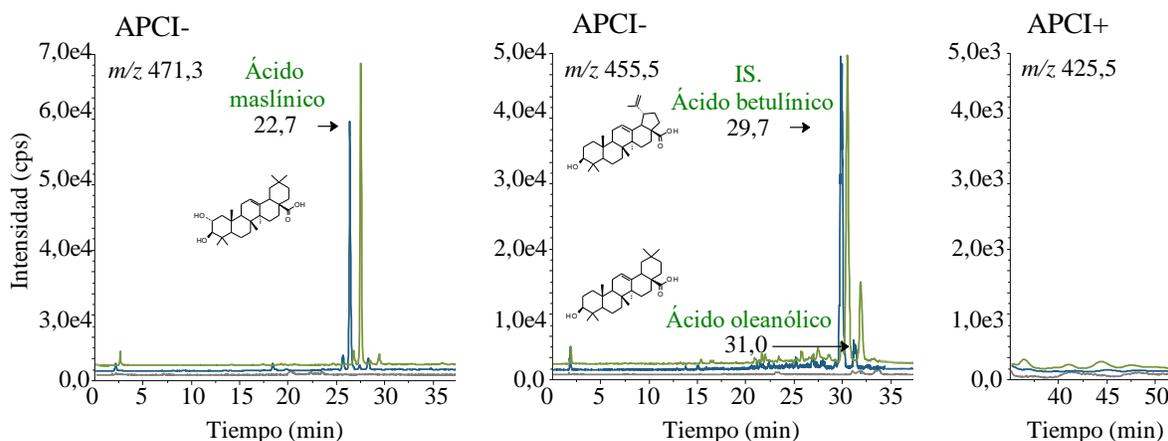


Figura 4.36. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el plasma de los sujetos sanos 1 hora después del consumo de las aceitunas. Se representan el grupo de 60 aceitunas (línea azul) y el grupo de 120 aceitunas (línea verde). La línea gris indica el XIC en el plasma de los sujetos que aún no han consumido las aceitunas.

b) Metabolitos del ácido maslínico

A partir de la identificación de los metabolitos del ácido maslínico en el estudio farmacocinético con ratas SD, se buscaron los metabolitos de este compuesto en el plasma de los sujetos sanos siguiendo los parámetros de espectrometría del compuesto padre.

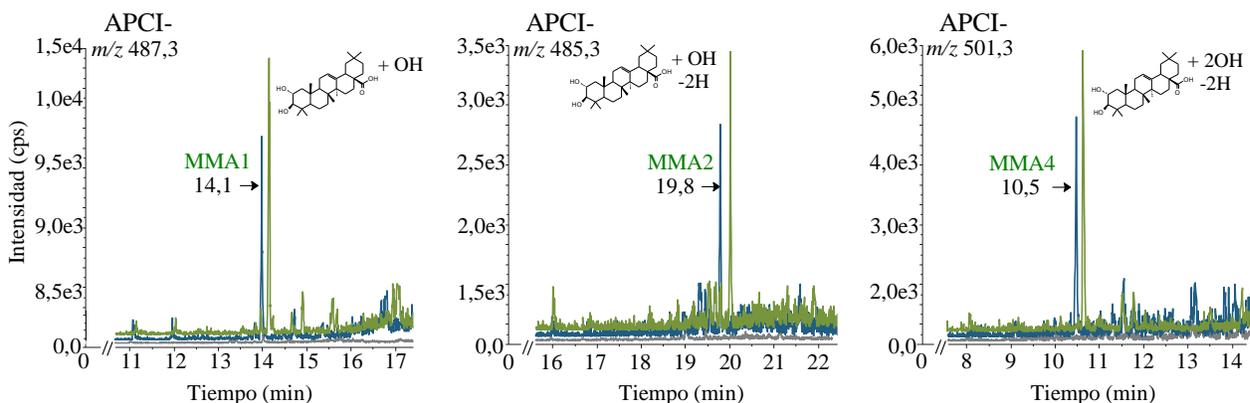


Figura 4.37. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-APCI-MS de los metabolitos del ácido maslínico encontrados en el plasma de los sujetos sanos 4 horas después del consumo de las aceitunas. Se representan el grupo de 60 aceitunas (línea azul) y el grupo de 120 aceitunas (línea verde). La línea gris indica el XIC en el plasma de los sujetos que aún no han consumido las aceitunas.

Resultados

Además, se comprobó la presencia de los metabolitos comparando sus XIC con los presentados en el plasma de los voluntarios antes de consumir las aceitunas, para asegurar que en los blancos no se detectaban los metabolitos. En el plasma de los hombres que consumieron aceitunas se encontraron 3 metabolitos del ácido maslínico: 1 metabolito monohidroxilado (MMA1); 1 metabolito monohidroxilado y deshidrogenado (MMA2) y 1 metabolito dihidroxilado y deshidrogenado (MMA4). Debido a la ausencia de los estándares de estos compuestos, no es posible conocer la posición exacta de estos grupos funcionales. Los cromatogramas representativos de los metabolitos del ácido maslínico después del consumo de las aceitunas Arbequina pueden observarse en la figura 4.37.

c) Metabolitos del ácido oleanólico

Se buscaron los metabolitos del ácido oleanólico en el plasma de los sujetos sanos a partir de la identificación de estos compuestos en el estudio farmacocinético con ratas SD y siguiendo los parámetros de espectrometría del compuesto padre. Como resultado se obtuvo que no se encontraron metabolitos de fase I y II del ácido oleanólico en el plasma de los participantes.

4.4.1.5. Farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos después del consumo de aceitunas en hombres sanos

a) Ácido maslínico

Se encontraron concentraciones basales de ácido maslínico antes de ingerir las aceitunas, las cuales fueron de $30,7 \pm 4,87$ nM ($n = 18$) y $21,6 \pm 3,07$ nM ($n = 18$) en los sujetos asignados a los grupos de ingestión de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. Se consideró que estas concentraciones plasmáticas son resultado de la dieta habitual de los participantes, por lo que el valor basal de cada sujeto fue restado a sus valores presentados durante todo el experimento. Teniendo en cuenta lo anterior, se encontró que el ácido maslínico estuvo presente en el plasma de los sujetos desde las 0,5 horas hasta las 24 horas posteriores al consumo de las Arbequinas (Figura 4.38). Además, durante todo el ensayo, las concentraciones plasmáticas producidas por la ingestión de 120 aceitunas ($n = 18$) fueron estadísticamente superiores a las producidas por la ingesta de 60 aceitunas ($n = 18$), ($p < 0,05$). En relación con la farmacocinética de este triterpeno, el AUC_{extrap} en ambos grupos de aceitunas fue igual o menor al 20%, esto indica que las fracciones extrapolables al infinito de los parámetros farmacocinéticos fueron estimadas con precisión. Por ello, los parámetros a considerar para el análisis farmacocinético no compartimental del ácido maslínico y de sus metabolitos fueron los estimados hasta el infinito. Como se observa en la tabla 4.41, la T_{max} fue alcanzada después de 3,61 horas del consumo de 60 aceitunas y de 5,00 horas de la toma de 120 aceitunas.

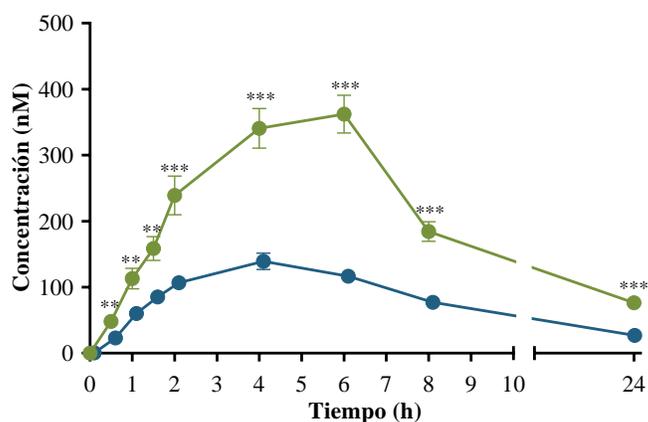


Figura 4.38. Concentraciones de ácido maslínico encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas. Se representan los grupos de 60 aceitunas (línea azul, $n = 18$) y 120 aceitunas (línea verde, $n = 18$). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla 4.41. Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos.

	60 aceitunas	120 aceitunas	p^*
Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico (nM)			
0,5 h	22,6 \pm 4,51	48,2 \pm 7,35	0,006
1 h	59,6 \pm 7,10	113 \pm 15,7	0,005
1,5 h	84,8 \pm 10,2	159 \pm 18,2	0,002
2 h	106 \pm 1,73	239 \pm 29,2	0,001
4 h	139 \pm 12,5	341 \pm 30,2	0,001
6 h	116 \pm 10,5	362 \pm 28,8	0,001
8 h	76,9 \pm 10,0	184 \pm 14,8	0,001
24 h	26,7 \pm 3,87	76,5 \pm 7,80	0,001
Parámetros farmacocinéticos del ácido maslínico			
T_{max} (h)	3,61 \pm 0,35	5,00 \pm 0,33	0,007
C_{max} (nM)	153 \pm 10,6	391 \pm 26,3	0,001
AUC_{extrap} (%)	20,8 \pm 3,79	20,1 \pm 1,67	0,859
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	2020 \pm 199	5053 \pm 406	0,001
AUC_{last} (nM·h)	1527 \pm 133	3971 \pm 287	0,001
λ_z (1/h)	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,438
$t_{1/2}$ (h)	11,0 \pm 1,76	9,47 \pm 0,50	0,411
$MTR_{0-\infty}$ (h)	16,9 \pm 2,30	15,4 \pm 0,75	0,523
MTR_{last} (h)	9,02 \pm 0,30	9,55 \pm 0,20	0,151

Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas ($n = 18$) y 120 aceitunas ($n = 18$). * Los datos de las concentraciones plasmáticas fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. Los datos de los parámetros farmacocinéticos fueron analizados mediante t de Student comparando los dos grupos de intervención con aceitunas.

Resultados

Además, la C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ y AUC_{last} fueron estadísticamente mayores tras el consumo de 120 Arbequinas. Del $AUC_{0-\infty}$ total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el ácido maslínico comprendió el 84% y el 87% en los grupos de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. Por último, los parámetros farmacocinéticos relacionados al tiempo medio de permanencia ($MTR_{0-\infty}$ y MTR_{last}) y a la vida media del ácido maslínico en plasma ($t_{1/2}$), no fueron estadísticamente diferentes entre dosis

b) Metabolito monohidroxilado MMA1

Las concentraciones basales del MMA1 antes de ingerir las aceitunas fueron de $1,94 \pm 0,75$ nM ($n = 18$) y $1,46 \pm 0,52$ nM ($n = 18$) en los sujetos asignados a los grupos de ingestión de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. Al igual que el compuesto padre, el valor basal de cada sujeto fue restado a sus valores presentados durante todo el experimento. De todos los derivados del ácido maslínico, el MMA1 fue el metabolito que se encontró en mayor concentración en el plasma de los sujetos que consumieron 60 aceitunas ($n = 18$) y 120 aceitunas ($n = 18$). El MMA1 fue detectado en plasma durante las 24 horas del ensayo y como puede observarse en la figura 4.39 y en la tabla 4.42, las concentraciones plasmáticas de este metabolito aportadas por el consumo de 120 aceitunas fueron estadísticamente superiores a las producidas por la ingesta de 60 aceitunas ($p < 0,05$).

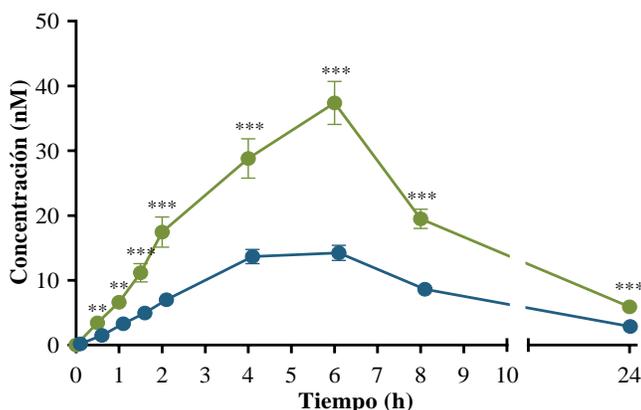


Figura 4.39. Concentraciones de MMA1 encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas. Se representan los grupos de 60 aceitunas (línea azul, $n = 18$) y 120 aceitunas (línea verde, $n = 18$). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En relación con la farmacocinética, el AUC_{extrap} en ambos grupos de aceitunas fue igual o menor al 20%. Por otra parte, la T_{max} fue alcanzada después de 5,5 horas del consumo de cualquiera de las dosis de aceitunas. Además, la C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ y AUC_{last} fueron estadísticamente superiores tras el consumo de 120 Arbequinas.

Del AUC_{0-∞} total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el MMA1 comprendió el 11% y el 7% en los grupos de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. Por último, los parámetros farmacocinéticos relacionados al tiempo medio de permanencia (MTR_{0-∞} y MTR_{last}) y a la vida media del MMA1 en plasma (t_{1/2}), no fueron estadísticamente diferentes entre dosis (Tabla 4.42).

Tabla 4.42. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxilado MMA1 y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos.

	60 aceitunas	120 aceitunas	p*
Concentraciones plasmáticas de MMA1 (nM)			
0,5 h	1,31 ± 0,20	3,46 ± 0,48	0,003
1 h	3,11 ± 0,32	6,62 ± 0,99	0,003
1,5 h	4,77 ± 0,63	11,2 ± 1,41	0,001
2 h	6,79 ± 0,87	17,5 ± 2,33	0,001
4 h	13,5 ± 1,09	28,8 ± 3,03	0,001
6 h	14,0 ± 1,15	37,4 ± 3,31	0,001
8 h	8,44 ± 0,81	19,5 ± 1,50	0,001
24 h	2,69 ± 0,46	5,92 ± 0,62	0,001
Parámetros farmacocinéticos del MMA1			
T _{max} (h)	5,33 ± 1,37	5,56 ± 0,20	0,564
C _{max} (nM)	16,0 ± 0,95	38,3 ± 3,33	0,001
AUC _{extrap} (%)	20,1 ± 5,00	15,7 ± 1,86	0,423
AUC _{0-∞} (nM·h)	258 ± 71,4	433 ± 33,5	0,034
AUC _{last} (nM·h)	152 ± 10,8	362 ± 27,3	0,001
λ _z (1/h)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,669
t _{1/2} (h)	16,2 ± 8,02	7,92 ± 0,55	0,312
MTR _{0-∞} (h)	25,6 ± 11,5	13,9 ± 0,77	0,318
MTR _{last} (h)	9,47 ± 0,35	9,61 ± 0,19	0,712

Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas (n = 18) y 120 aceitunas (n = 18). * Los datos de las concentraciones plasmáticas fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. Los datos de los parámetros farmacocinéticos fueron analizados mediante t de Student comparando los dos grupos de intervención con aceitunas.

c) Metabolito monohidroxilado y deshidrogenado MMA2

Las concentraciones basales del MMA2 fueron de 0,51 ± 0,22 nM (n = 18) y 0,43 ± 0,31 nM (n = 18) en los sujetos asignados a los grupos de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. El valor basal de cada sujeto fue restado a sus valores presentados durante todo el experimento permitiendo la detección de este metabolito durante las 24 horas del ensayo en ambas intervenciones.

Resultados

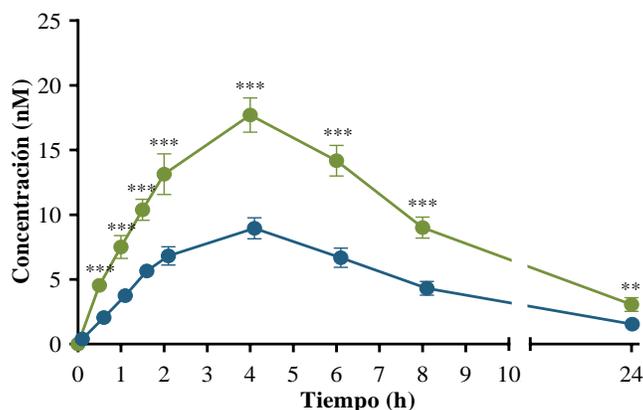


Figura 4.40. Concentraciones de MMA2 encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas. Se representan los grupos de 60 aceitunas (línea azul, $n = 18$) y 120 aceitunas (línea verde, $n = 18$). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla 4.43. Concentraciones plasmáticas del metabolito monohidroxiado y deshidrogenado MMA2 y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos.

	60 aceitunas	120 aceitunas	p^*
Concentraciones plasmáticas de MMA2 (nM)			
0,5 h	1,65 \pm 0,26	4,53 \pm 0,47	0,001
1 h	3,36 \pm 0,40	7,50 \pm 0,88	0,001
1,5 h	5,26 \pm 0,51	10,4 \pm 0,81	0,001
2 h	6,42 \pm 0,70	13,1 \pm 1,57	0,001
4 h	8,56 \pm 0,81	17,7 \pm 1,34	0,001
6 h	6,27 \pm 0,75	14,2 \pm 1,19	0,001
8 h	3,92 \pm 0,53	9,01 \pm 0,81	0,001
24 h	1,14 \pm 0,21	3,06 \pm 0,52	0,003
Parámetros farmacocinéticos del MMA2			
T_{max} (h)	3,86 \pm 0,31	4,00 \pm 0,28	0,743
C_{max} (nM)	9,72 \pm 0,85	19,5 \pm 1,53	0,001
AUC_{extrap} (%)	15,5 \pm 2,76	17,4 \pm 2,49	0,627
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	87,2 \pm 8,98	210 \pm 23,0	0,001
AUC_{last} (nM·h)	72,6 \pm 7,51	169 \pm 15,9	0,001
λ_z (1/h)	0,17 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02	0,374
$t_{1/2}$ (h)	6,80 \pm 1,14	7,37 \pm 1,03	0,710
$MTR_{0-\infty}$ (h)	11,2 \pm 1,44	12,1 \pm 1,39	0,636
MTR_{last} (h)	7,27 \pm 0,54	7,87 \pm 0,53	0,438

Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas ($n = 18$) y 120 aceitunas ($n = 18$). * Los datos de las concentraciones plasmáticas fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. Los datos de los parámetros farmacocinéticos fueron analizados mediante t de Student comparando los dos grupos de intervención con aceitunas.

Además, como se puede apreciar en la figura 4.40 y en la tabla 4.43, las concentraciones plasmáticas del metabolito MMA2 fueron estadísticamente superiores cuando se consumieron 120 aceitunas ($p < 0,05$). En relación con la farmacocinética de MMA2, el AUC_{extrap} fue menor al 20% en ambos grupos de intervención con aceitunas, la T_{max} fue alcanzada después de 4 horas de la ingesta de 60 o 120 Arbequinas y la C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ y AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después del consumo de 120 aceitunas. Además, del $AUC_{0-\infty}$ total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el MMA2 comprendió el 4% para ambas intervenciones con Arbequinas. Por último, los parámetros farmacocinéticos relacionados al tiempo medio de permanencia y a la vida media del MMA2 en plasma no fueron estadísticamente diferentes entre dosis (Tabla 4.43).

d) Metabolito dihidroxilado y deshidrogenado MMA4

Las concentraciones basales del MMA4 fueron de $0,51 \pm 0,24$ nM ($n = 18$) y $0,25 \pm 1,17$ nM ($n = 18$) en los sujetos asignados a los grupos de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. Por ello, el valor basal de cada sujeto fue restado a sus valores presentados durante todo el experimento. De todos los derivados del ácido maslínico, el MMA4 fue el metabolito que se encontró en menor concentración plasmática. No obstante, estuvo presente en el plasma de los participantes desde las 0,5 horas hasta las 24 horas posteriores al consumo de las Arbequinas en concentraciones inferiores a 15 nM, siendo estadísticamente superiores las concentraciones plasmáticas producidas por el consumo de 120 aceitunas ($p < 0,05$), (Figura 4.41). En relación con la farmacocinética de MMA4, el AUC_{extrap} en ambos grupos de intervención con aceitunas fue menor al 20%. La T_{max} , alcanzada después de 4,31 horas del consumo de 60 aceitunas y de 5,44 horas de la ingesta de 120 aceitunas, fue estadísticamente diferente.

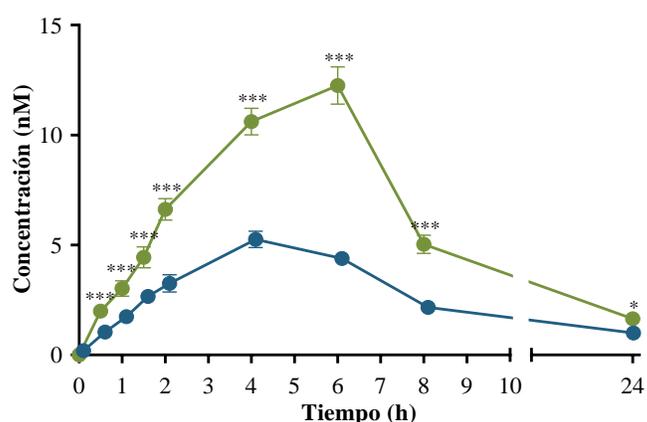


Figura 4.41. Concentraciones de MMA4 encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas. Se representan los grupos de 60 aceitunas (línea azul, $n = 18$) y 120 aceitunas (línea verde, $n = 18$). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Además, la C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ y AUC_{last} fueron estadísticamente mayores tras el consumo de 120

Resultados

Arbequinas. Del $AUC_{0-\infty}$ total que acumularon el ácido maslínico y sus derivados; el MMA4 comprendió el 2% para ambas intervenciones con Arbequinas. Por último, los parámetros farmacocinéticos relacionados al tiempo medio de permanencia y a la vida media de este metabolito en plasma no fueron estadísticamente diferentes entre dosis (Tabla 4.44).

Tabla 4.44. Concentraciones plasmáticas del metabolito dihidroxilado y deshidrogenado MMA4 y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos.

	60 aceitunas	120 aceitunas	p^*
Concentraciones plasmáticas de MMA4 (nM)			
0,5 h	0,84 ± 0,11	2,00 ± 0,19	0,001
1 h	1,54 ± 0,15	3,03 ± 0,35	0,001
1,5 h	2,46 ± 0,26	4,44 ± 0,48	0,001
2 h	3,05 ± 0,40	6,62 ± 0,49	0,001
4 h	5,06 ± 0,38	10,6 ± 0,61	0,001
6 h	4,19 ± 0,30	12,3 ± 0,85	0,001
8 h	1,96 ± 0,20	5,03 ± 0,41	0,001
24 h	0,80 ± 0,15	1,65 ± 0,22	0,012
Parámetros farmacocinéticos del MMA4			
T_{max} (h)	4,31 ± 0,31	5,44 ± 0,22	0,005
C_{max} (nM)	5,57 ± 0,32	12,5 ± 0,81	0,001
AUC_{extrap} (%)	17,7 ± 2,19	16,2 ± 2,95	0,696
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	44,2 ± 4,41	97,5 ± 9,14	0,001
AUC_{last} (nM·h)	36,1 ± 3,52	81,6 ± 8,59	0,001
λ_z (1/h)	0,25 ± 0,05	0,34 ± 0,06	0,282
$t_{1/2}$ (h)	4,99 ± 0,92	3,72 ± 0,66	0,267
$MTR_{0-\infty}$ (h)	9,39 ± 1,19	8,01 ± 0,82	0,369
MTR_{last} (h)	6,45 ± 0,57	6,06 ± 0,52	0,609

Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas ($n = 18$) y 120 aceitunas ($n = 18$). * Los datos de las concentraciones plasmáticas fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. Los datos de los parámetros farmacocinéticos fueron analizados mediante t de Student comparando los dos grupos de intervención con aceitunas.

e) Ácido oleanólico

Se encontraron concentraciones basales de ácido oleanólico de $5,23 \pm 0,36$ nM ($n = 18$) y $5,41 \pm 0,59$ nM ($n = 18$) en los sujetos asignados a los grupos de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. Se consideró que estas concentraciones son resultado de la dieta habitual de los participantes, por lo que el valor basal de cada sujeto fue restado a sus valores presentados durante todo el experimento.

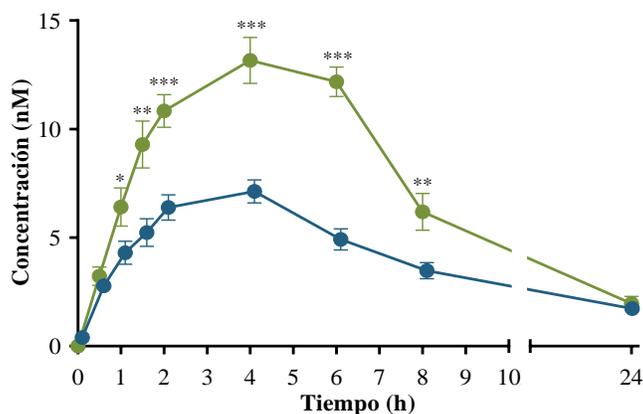


Figura 4.42. Concentraciones de ácido oleanólico encontradas en el plasma de hombres sanos después del consumo de las aceitunas. Se representan los grupos de 60 aceitunas (línea azul, $n = 18$) y 120 aceitunas (línea verde, $n = 18$). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla 4.45. Concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico y sus parámetros farmacocinéticos después del consumo de 60 y 120 aceitunas en hombres sanos.

	60 aceitunas	120 aceitunas	p^*
Concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico (nM)			
0,5 h	2,38 \pm 0,27	3,22 \pm 0,43	0,107
1 h	3,90 \pm 0,53	6,41 \pm 0,88	0,022
1,5 h	4,84 \pm 0,64	9,27 \pm 1,08	0,002
2 h	5,99 \pm 0,58	10,8 \pm 0,75	0,001
4 h	6,73 \pm 0,53	13,2 \pm 1,07	0,001
6 h	4,52 \pm 0,49	12,2 \pm 0,68	0,001
8 h	3,07 \pm 0,37	6,19 \pm 0,85	0,003
24 h	1,33 \pm 0,24	1,97 \pm 0,34	0,133
Parámetros farmacocinéticos del ácido oleanólico			
T_{max} (h)	2,61 \pm 0,35	4,39 \pm 0,37	0,001
C_{max} (nM)	8,00 \pm 0,50	15,0 \pm 0,90	0,001
AUC_{extrap} (%)	21,4 \pm 4,47	13,3 \pm 2,29	0,118
$AUC_{0-\infty}$ (nM·h)	101 \pm 14,6	162 \pm 16,2	0,009
AUC_{last} (nM·h)	69,9 \pm 6,46	136 \pm 10,9	0,001
λ_z (1/h)	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,429
$t_{1/2}$ (h)	11,9 \pm 2,54	7,72 \pm 0,74	0,127
$MTR_{0-\infty}$ (h)	17,8 \pm 3,63	12,2 \pm 1,06	0,143
MTR_{last} (h)	8,54 \pm 0,41	8,27 \pm 0,33	0,601

Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas ($n = 18$) y 120 aceitunas ($n = 18$). * Los datos de las concentraciones plasmáticas fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. Los datos de los parámetros farmacocinéticos fueron analizados mediante t de Student comparando los dos grupos de intervención con aceitunas.

Resultados

El ácido oleanólico estuvo presente en el plasma de los participantes después del consumo de las Arbequinas durante las 24 horas del ensayo, siendo estadísticamente superiores ($p < 0,05$) las concentraciones plasmáticas del triterpeno a las 1, 1,5, 2, 4, 6 y 8 horas después del consumo de 120 aceitunas ($n = 18$) en comparación con la ingesta de 60 aceitunas ($n = 18$), (Figura 4.42).

En relación con la farmacocinética de este triterpeno, el AUC_{extrap} en el grupo de 60 aceitunas fue mayor a 20%, esto indica que las fracciones extrapolables al infinito de los parámetros farmacocinéticos necesitan más puntos en la fase de eliminación para obtener una estimación más precisa. Por ello, los parámetros a considerar para el análisis farmacocinético no compartimental del ácido oleanólico fueron los estimados hasta la última concentración reportada (Tabla 4.46). La T_{max} , alcanzada después de 2,61 horas del consumo de 60 aceitunas y de 4,39 horas de la ingesta de 120 aceitunas, fue estadísticamente diferente. Además, la C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ y AUC_{last} fueron estadísticamente superiores después del consumo de 120 Arbequinas. Por último, los parámetros farmacocinéticos relacionados al tiempo medio de permanencia y a la vida media de este triterpeno en plasma no fueron estadísticamente diferentes entre dosis (Tabla 4.45).

4.4.2. Fase 2. Concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos después de la ingesta de aceitunas Arbequina durante 30 días en sujetos sanos

4.4.2.1. Características de los participantes

En esta etapa del ensayo clínico, se estudió la concentración plasmática de los triterpenos pentacíclicos en hombres y mujeres sanos que consumieron 60 aceitunas de mesa de la variedad Arbequina durante 30 días.

Los 40 participantes, 20 hombres y 20 mujeres, fueron asignados a ambas intervenciones de forma aleatoria: aceitunas arbequina o control, teniendo un periodo de lavado de 14 días entre las intervenciones.

Antes de iniciar el ensayo clínico, se evaluaron las características de los participantes obteniendo los resultados descritos en la tabla 4.46.

No se informaron efectos adversos derivados de la intervención nutricional con aceitunas y todos los voluntarios presentaron buena salud durante todo el estudio.

Tabla 4.46. Características de los participantes antes de iniciar la intervención nutricional con 60 aceitunas de mesa durante 30 días.

Variable	Resultado	Variable	Resultado
Características generales		ALT (U/l)	20,3 ± 1,88
Edad (años)	40,5 ± 1,07	Fosfatasa alcalina (U/l)	68,7 ± 2,99
Peso (kg)	74,4 ± 2,00	Proteínas totales (g/l)	71,9 ± 0,56
Estatura (cm)	168 ± 1,38	Perfil lipídico	
IMC (kg/m ²)	26,2 ± 0,47	Triglicéridos (mM)	0,93 ± 0,06
Circunferencia abdominal (cm)	88,7 ± 1,94	Colesterol total (mM)	4,92 ± 0,13
Pruebas analíticas		Colesterol HDL (mM)	1,31 ± 0,05
Sodio (mEq/l)	140 ± 0,23	Colesterol LDL (mM)	3,18 ± 0,14
Glucosa (mM)	4,54 ± 0,07	Colesterol VLDL (mM)	0,43 ± 0,03
Urea (mM)	5,22 ± 0,16	Presión arterial	
Creatinina (mM)	69,3 ± 1,78	Sistólica (mm Hg)	117 ± 1,91
AST (U/l)	18,0 ± 0,75	Diastólica (mm Hg)	64,5 ± 1,49
Ácido úrico (mM)	296 ± 11,2		

IMC, índice de masa corporal; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; VLDL, very low density lipoprotein. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media ($n = 18$).

4.4.2.2. Cantidad de triterpenos pentacíclicos consumidos por los participantes

En este ensayo, se utilizaron las aceitunas Arbequina de la cosecha 2015-2016 cuyas concentraciones de triterpenos pentacíclicos se describen en el apartado 4.1.3. Considerando que cada aceituna de mesa utilizada en este ensayo tiene en promedio un peso de $1,52 \pm 0,03$ g y sin hueso las Arbequinas pesan aproximadamente $1,10 \pm 0,02$ g, la cantidad de pulpa de aceitunas ingerida por los sujetos fue alrededor de 66 g. Por lo tanto, las cantidades promedio de los triterpenos pentacíclicos encontradas en 60 aceitunas y que fueron ingeridas por los voluntarios se muestran previamente en la tabla 4.38.

4.4.2.3. Validación del método de análisis de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS

a) Precisión y exactitud

La precisión y la exactitud fueron determinadas en dos muestras preparadas a once niveles de concentración (2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750). La variabilidad intra-ensayo e inter-ensayo estuvo por debajo del 15% en todas las concentraciones, cumpliendo con los requisitos establecidos por la EMA. Por otro lado, la exactitud fue satisfactoria, mostrando una desviación porcentual menor al 15% (Tabla 4.47).

Resultados

Tabla 4.47. Precisión y exactitud del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de los sujetos sanos por LC-APCI-MS.

Compuesto	Precisión intra-ensayo (CV %)										
	2,5 nM	5 nM	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200n M	300 nM	400 nM	500 nM	750 nM
Ácido maslínico	6,81	3,89	12,6	4,91	7,81	1,82	5,08	0,52	1,79	1,77	0,87
Ácido oleanólico	4,57	5,08	2,08	0,30	5,57	0,77	1,00	0,96	3,62	3,68	2,28
Ácido ursólico	0,56	10,9	6,39	3,12	0,46	0,95	3,32	2,78	1,62	2,71	2,01
Eritrodiol	0,06	3,83	2,17	9,94	0,04	2,22	2,00	3,12	1,86	1,73	1,65
Uvaol	9,54	10,8	4,80	8,31	10,5	2,32	0,97	2,26	2,58	0,23	0,65
Precisión intra-ensayo (CV %)											
Ácido maslínico	5,61	2,95	11,2	5,85	6,56	2,89	4,23	2,65	1,23	1,58	0,49
Ácido oleanólico	3,37	4,18	1,18	0,60	6,89	0,27	1,89	1,97	4,62	3,26	2,48
Ácido ursólico	0,76	9,97	5,49	6,12	0,86	0,53	2,23	7,20	9,89	2,78	2,79
Eritrodiol	0,10	2,80	0,17	10,9	0,15	5,21	2,89	2,16	1,56	1,46	1,16
Uvaol	10,5	9,81	3,82	10,1	9,54	4,38	2,92	8,63	2,26	0,27	0,27
Exactitud (%)											
Ácido maslínico	-5,66	-2,49	-6,19	5,08	-1,26	-9,22	3,28	3,38	2,58	-1,16	6,08
Ácido oleanólico	-5,63	-11,2	-10,2	-14,8	-7,63	0,13	5,49	5,89	-2,87	-0,94	-9,88
Ácido ursólico	0,86	5,14	-5,04	-8,07	0,86	-5,45	-4,04	1,08	1,08	0,04	-7,07
Eritrodiol	-13,0	6,68	-1,34	-7,40	-12,0	4,30	7,55	-5,58	1,09	-0,21	-6,40
Uvaol	-8,72	-14,4	14,3	-1,00	-6,72	-10,1	3,76	5,39	-3,27	0,41	-2,00

CV, Coeficiente de variación. Los valores son presentados como media en el intra-ensayo ($n = 4$), inter-ensayo ($n = 2$) y exactitud ($n = 2$).

b) Linealidad y sensibilidad

La linealidad del método fue evaluada comparando las regresiones lineales de las dos curvas de calibración obtenidas en dos días diferentes en un rango de concentración de 0 a 750 nM. Los coeficientes de correlación fueron mayores a 0,995 para todos los compuestos.

La sensibilidad, evaluada también en dos días diferentes, demostró que el LOD del ácido maslínico, oleanólico y ursólico fue inferior a 0,56 nM, mientras que el LOD del eritrodiol y del uvaol fue de 1,89 nM y 3,95 nM, respectivamente.

Respecto al LLOQ, los valores presentados por los triterpenos ácidos fueron menores a 0,76 nM, mientras que para el eritrodiol y el uvaol fueron de 2,50 nM y 5,46 nM, respectivamente (Tabla 4.48).

Tabla 4.48. Linealidad y sensibilidad del método para determinar triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-APCI-MS.

Triterpeno pentacíclico	Linealidad		Sensibilidad	
	Ecuación	R^2	LOD (nM)	LLOQ (nM)
Ácido maslínico	$y = (0,00768 \pm 0,00038)x - (3,707e^7 \pm 2,166e^7)$	0,998	0,20	0,65
Ácido oleanólico	$y = (0,00782 \pm 0,00108)x - (1,060e^6 \pm 2,785e^6)$	0,997	0,18	0,56
Ácido ursólico	$y = (0,00657 \pm 0,00109)x + (0,00559 \pm 0,00750)$	0,995	0,56	0,76
Eritrodiol	$y = (0,00477 \pm 0,00039)x - (0,00303 \pm 0,00072)$	0,998	1,89	2,50
Uvaol	$y = (0,00114 \pm 0,00070)x - (0,00111 \pm 0,00779)$	0,996	3,95	5,46

y, área ratio (analito/patrón interno); x, concentración de los triterpenos (nM); R^2 , coeficiente de correlación; LOD, límite de detección (relación ruido-síñal 3:1); LLOQ, límite más bajo de cuantificación (relación ruido-síñal 5:1). Los resultados de las ecuaciones son expresados en media y desviación estándar de los dos días evaluados. Los resultados del R^2 , LOD y LLOQ se representan como las medias de los dos días evaluados.

4.4.2.4. Identificación de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos por LC-MS

El ácido maslínico y el ácido oleanólico fueron identificados en el plasma de los participantes después del consumo de 60 aceitunas Arbequina. Además, no se detectó la presencia de ácido ursólico, eritrodiol o uvaol.

Por otra parte, el en grupo control se detectaron pequeñas cantidades de ácido maslínico y ácido oleanólico que probablemente provenían de la dieta.

Los cromatogramas representativos de los triterpenos pentacíclicos identificados en el plasma de los sujetos 30 días después del consumo de las Arbequinas, pueden observarse en la figura 4.43.

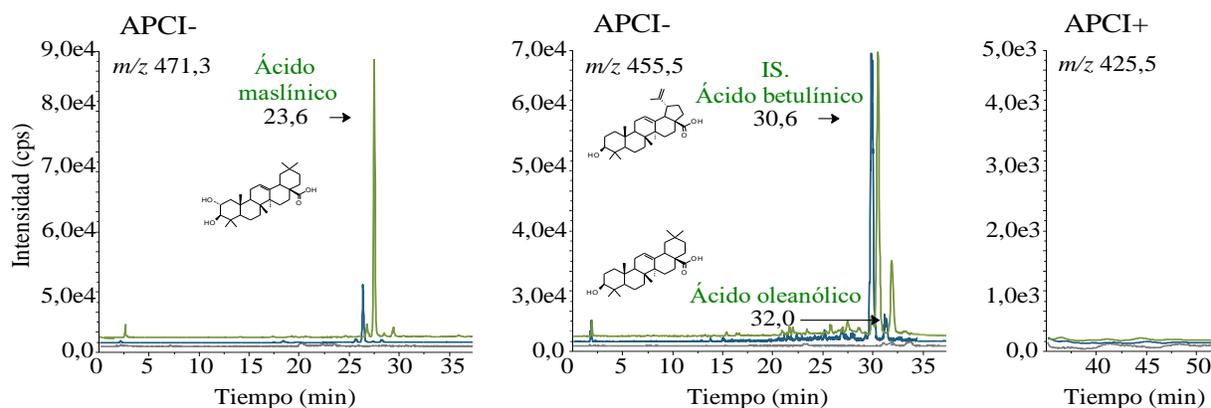


Figura 4.43. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) obtenidos por LC-APCI-MS de los triterpenos pentacíclicos encontrados en el plasma de los sujetos 30 días después del consumo de 60 aceitunas. Se representan el grupo control (línea azul) y el grupo que consumió 60 Arbequinas (línea verde). La línea gris indica el XIC en el plasma blanco.

Resultados

4.4.2.5. Concentración de triterpenos pentacíclicos en plasma de sujetos sanos

El ácido maslínico estuvo presente en el plasma de todos los sujetos durante todo el ensayo. En el grupo control las concentraciones plasmáticas pudieron ser resultado de la dieta de los participantes, estos valores estuvieron por debajo de los 30 nM. Por otra parte, el consumo de 60 aceitunas incrementó los valores de ácido maslínico en plasma superando los 250 nM a los 15 y 30 días del ensayo (Tabla 4.49).

Las concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico en el grupo control fueron inferiores a 5 nM, pudiendo ser resultado de la dieta de los participantes. Por otra parte, la ingesta de 60 Arbequinas aumentó la concentración plasmática de ácido oleanólico superando los 10 nM a los 15 y 30 días del experimento (Tabla 4.49).

Tabla 4.49. Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico y ácido oleanólico 15 y 30 días después del consumo diario de 60 aceitunas en sujetos sanos.

	Control (nM)	60 aceitunas (nM)	<i>p</i> [*]
Concentraciones plasmáticas de ácido maslínico (nM)			
15 d	19,2 ± 4,23	275 ± 33,2	0,001
30 d	21,4 ± 7,41	287 ± 33,9	0,001
Concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico (nM)			
15 d	4,35 ± 0,39	15,4 ± 1,61	0,025
30 d	3,40 ± 0,80	11,4 ± 0,97	0,017

Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos control (*n* = 40) y 60 aceitunas (*n* = 40). * Los datos fueron analizados mediante la prueba *t* de Student comparando los dos grupos de estudio.

4.5. Capítulo V. Intervención nutricional: efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina sobre la presión arterial y el peso corporal en voluntarios sanos

4.5.1. Efecto del consumo de una dosis única de aceitunas Arbequina sobre la presión arterial en voluntarios sanos

La PA sistólica y diastólica de los participantes fue evaluada después de la ingestión de 60 aceitunas ($n = 18$) o 120 aceitunas ($n = 18$) durante 24 horas. Antes del consumo de las Arbequinas, la PA sistólica fue de $118 \pm 1,41$ mm Hg en ambos grupos de intervención con aceitunas. A partir de las 0,5 horas de la ingesta de 60 Arbequinas, la PA sistólica disminuyó, siendo estadísticamente significativo desde la primera hora hasta las 4 horas del ensayo ($p < 0,05$). La máxima disminución de 8% se encontró a las 2 horas del consumo de las 60 aceitunas. Por otra parte, la PA sistólica de los sujetos que consumieron 120 Arbequinas se redujo de forma estadísticamente significativa desde las 0,5 horas hasta las 8 horas del estudio ($p < 0,05$). La máxima disminución de 6% se encontró a las 2 horas del consumo de las 120 aceitunas. Después de 24 horas del consumo de las aceitunas, la PA sistólica de ambos grupos se reestableció alcanzando los $116 \pm 1,35$ mm Hg (Figura 4.44). Por último, cuando se compararon ambos grupos de tratamiento con aceitunas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.50).

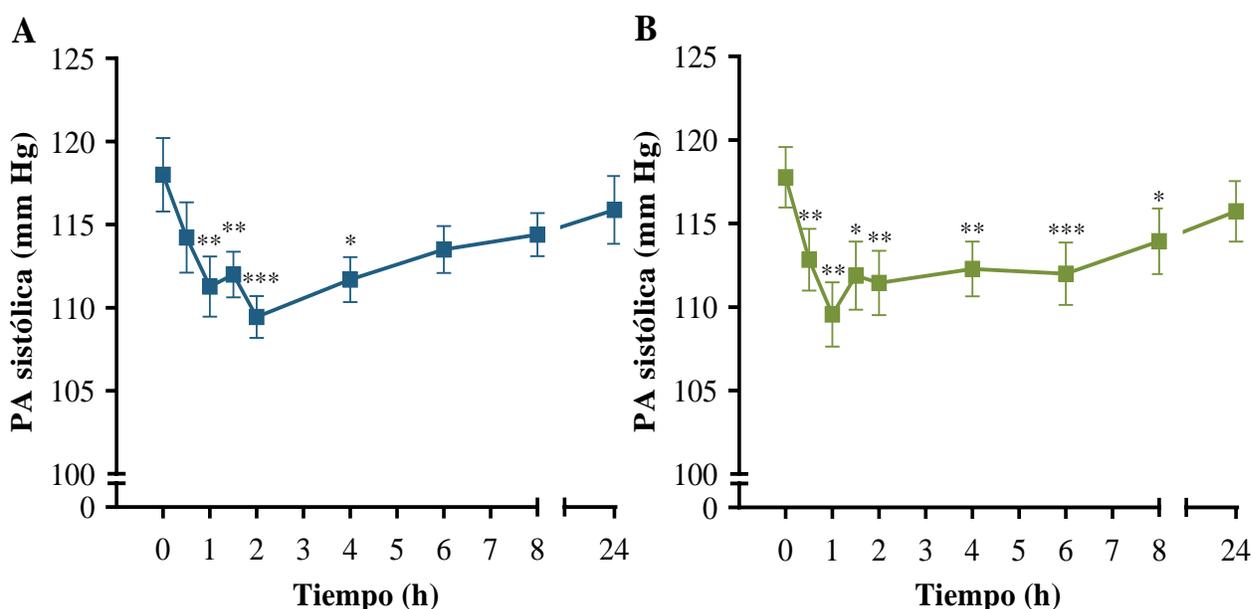


Figura 4.44. Presión arterial (PA) después del consumo de aceitunas en sujetos sanos. El gráfico muestra los valores de PA sistólica después del consumo de 60 aceitunas (A) o 120 aceitunas (B). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media del grupo 60 aceitunas ($n = 18$) y el grupo 120 aceitunas ($n = 18$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Resultados

En relación con la PA diastólica, esta se mantuvo estable en ambos grupos durante las 24 horas del estudio agudo. De esta manera, no se encontraron diferencias significativas tanto en el grupo 60 aceitunas como en el grupo 120 aceitunas cuando se compararon sus valores de PA diastólica de las 0 horas con los presentados en cada grupo a las 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8 y 24 horas. Al mismo tiempo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon ambos grupos de tratamiento con aceitunas (Tabla 4.50).

Tabla 4.50. Efecto de una dosis única de 60 o 120 aceitunas sobre la presión arterial sistólica y diastólica en sujetos sanos.

	PA sistólica (mm Hg)				PA diastólica (mm Hg)			
	60 aceitunas	120 aceitunas	Δ	p^*	60 aceitunas	120 aceitunas	Δ	p^*
0 h	118 ± 2,21	118 ± 1,81	0	0,939	63,1 ± 1,67	61,6 ± 1,67	2	0,492
0,5 h	115 ± 2,07	113 ± 1,84	2	0,427	65,7 ± 1,81	63,8 ± 1,67	2	0,387
1 h	111 ± 1,82	110 ± 1,93	1	0,520	64,4 ± 1,18	63,4 ± 1,67	1	0,629
1,5h	112 ± 1,37	112 ± 2,05	0	0,964	61,9 ± 1,68	61,6 ± 1,67	0	0,859
2 h	109 ± 1,26	111 ± 1,93	2	0,393	62,6 ± 1,44	62,0 ± 1,67	1	0,779
4 h	112 ± 1,35	112 ± 1,68	0	0,783	62,4 ± 1,14	62,1 ± 1,67	0	0,879
6 h	114 ± 1,42	112 ± 1,86	2	0,526	61,3 ± 1,25	60,6 ± 1,67	1	0,741
8 h	114 ± 1,29	114 ± 1,96	0	0,845	60,3 ± 1,17	60,1 ± 1,67	0	0,939
24 h	116 ± 2,04	116 ± 1,82	0	0,952	60,1 ± 0,98	59,1 ± 1,67	1	0,647

PA, presión arterial; h, horas después del consumo de las aceitunas. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas ($n = 18$) y 120 aceitunas ($n = 18$). Los datos fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Fischer. * comparación entre las dos dosis de aceitunas en el mismo tiempo observado.

4.5.2. Efecto del consumo de aceitunas Arbequina durante 30 días sobre el peso corporal y la presión arterial en voluntarios sanos

4.5.2.1. Efecto del consumo de las aceitunas de mesa en el peso corporal en sujetos sanos

A los 15 y 30 días del ensayo, no se encontraron diferencias en el peso corporal y el IMC de los participantes con respecto a sus valores basales ($n = 40$). Asimismo, la ingesta diaria de 60 aceitunas durante 30 días no modificó el peso corporal y el IMC de los voluntarios ($n = 40$) con respecto al grupo control (Tabla 4.51).

Tabla 4.51. Efecto de una intervención nutricional con 60 aceitunas sobre el peso corporal y el IMC en sujetos sanos.

	Peso corporal (g)				IMC (kg/m ²)			
	Control	60 aceitunas	Δ	p [*]	Control	60 aceitunas	Δ	p [*]
0 d	75,4 ± 2,10	75,2 ± 2,29	0	0,962	26,5 ± 0,48	26,4 ± 0,53	0	0,900
15 d	75,1 ± 2,15	75,3 ± 2,26	0	0,952	26,4 ± 0,50	26,5 ± 0,52	0	0,948
30 d	75,3 ± 2,33	75,0 ± 2,35	0	0,948	26,5 ± 0,54	26,4 ± 0,53	0	0,932

IMC, índice de masa corporal; d, días después del consumo de las aceitunas. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas ($n = 40$) y control ($n = 40$). Los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student. * comparación entre los dos grupos de estudio en el mismo tiempo observado.

4.5.2.2. Efecto del consumo de las aceitunas de mesa en la presión arterial en sujetos sanos

La PA sistólica y diastólica de los participantes fue evaluada antes del consumo de las Arbequinas y 15 y 30 días después de la ingestión de las 60 aceitunas ($n = 40$) mostrando que no existen diferencias en la PA con respecto a sus valores basales. Además, la PA no fue modificada por la ingesta de 60 Arbequinas en comparación con los valores presentados por el grupo control (Tabla 4.52).

Tabla 4.52. Efecto de una intervención nutricional con 60 aceitunas sobre la presión arterial sistólica y diastólica en sujetos sanos.

	PA sistólica (mm Hg)				PA diastólica (mm Hg)			
	Control	60 aceitunas	Δ	p [*]	Control	60 aceitunas	Δ	p [*]
0 d	116 ± 1,69	117 ± 1,77	+1	0,700	64,2 ± 1,51	63,2 ± 1,31	-1	0,601
15 d	115 ± 1,59	117 ± 1,88	+2	0,408	62,7 ± 1,31	62,7 ± 1,31	0	0,999
30 d	119 ± 1,68	117 ± 1,89	+2	0,602	66,0 ± 1,49	64,9 ± 1,38	-1	0,572

PA, presión arterial; d, días después del consumo de las aceitunas. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media de los grupos 60 aceitunas ($n = 40$) y control ($n = 40$). Los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student. * comparación entre los dos grupos de estudio en el mismo tiempo observado.

V. DISCUSIÓN

5. Discusión

El fruto procesado de *Olea europaea* L. es uno de los alimentos fermentados vegetales más antiguos de la cuenca mediterránea. Además del impacto económico para los países productores del área, principalmente España, Egipto, Turquía, Argelia, Italia, Grecia y Portugal, las aceitunas representan también un importante alimento saludable de la dieta mediterránea (Rocha *et al.*, 2020). En este sentido, las aceitunas se han incluido explícitamente en el segundo nivel de la pirámide de la dieta mediterránea con un consumo diario recomendado de una o dos porciones (15-30 g) (Serra-Majem *et al.*, 2020). La recomendación de la ingesta diaria de aceitunas como una opción de snack saludable surge por el alto contenido en lípidos monoinsaturados con un perfil equilibrado entre ácidos grasos monoinsaturados y saturados (Serra-Majem *et al.*, 2020). Además, este alimento podría tener un efecto beneficioso para la salud no solo por su elevado contenido en ácido oleico sino también por su contenido en minerales, vitaminas y fibra, junto con otros componentes menores como triterpenos pentacíclicos y polifenoles (Rocha *et al.*, 2020). Estos dos últimos grupos son metabolitos secundarios que las plantas sintetizan para su protección (Boskou, 2017), y que diversos estudios han demostrado que poseen propiedades beneficiosas para la salud tales como, agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, antihipertensivos y cardioprotectores (Sánchez-Quesada *et al.*, 2013; Lozano-Mena *et al.*, 2014; Malheiro *et al.*, 2014; Pedret *et al.*, 2018). A pesar del indiscutible valor nutricional de este alimento y su relevante contenido en compuestos fitoquímicos, existen pocos estudios que evalúen el efecto del consumo de la aceituna tanto *in vitro* como *in vivo* (Boskou, 2017; Rocha *et al.*, 2020). En consecuencia, en la presente tesis se ha profundizado en el estudio de la ingesta de aceitunas en ratas y voluntarios sanos sobre la farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y el efecto del consumo del fruto de *Olea europaea* L. sobre la presión arterial.

La variedad Arbequina se seleccionó como aceituna a estudiar debido a su elevada producción y consumo en Cataluña. Esta variedad ocupa más del 50% de la superficie catalana de olivar (Ninot *et al.*, 2019) y aunque mayoritariamente está dedicada a la producción de aceite, también es muy apreciada para ser consumida como aceituna en Cataluña (Tous y Romero, 1993). Cabe destacar que su elevada presencia en todo el mundo se debe a sus características de vigor y productividad haciéndola adecuada al tipo de plantación de alta densidad. Se estima que a escala internacional se han plantado cerca de 60.000 hectáreas de olivo, y en la actualidad la Arbequina es la mayoritaria en California (Ninot *et al.*, 2019). Además, también se ha tenido en cuenta su contenido en compuestos fitoquímicos. Así, estudios previos en los que se analizaron las concentraciones de triterpenos pentacíclicos y polifenoles en las variedades de aceituna Arbequina, Empeltre y Marfil mostraron que la Arbequina contenía concentraciones más elevadas de dichos compuestos (Moreno-González *et al.*, 2020a, 2020b).

Discusión

El primer objetivo de la presente tesis consistió en la caracterización del contenido en triterpenos y polifenoles de las aceitunas de la variedad Arbequina utilizadas tanto en el estudio farmacocinético como en la evaluación del efecto de su consumo sobre la presión arterial en ratas y voluntarios sanos. Los triterpenos pentacíclicos que se analizaron en Arbequinas procedieron de dos cosechas, la recogida en 2015-2016 y la recolectada en 2016-2017. Los resultados obtenidos en ambas añadas permitieron constatar que este grupo de compuestos alcanzaron un valor total de aproximadamente 3,50 g/kg, siendo el ácido maslínico el compuesto mayoritario ($2,61 \pm 0,27$ g/kg) seguido del ácido oleanólico ($0,95 \pm 0,09$ g/kg) y, por último, el eritrodiol ($0,015 \pm 0,005$ g/kg). Estos valores coinciden con los obtenidos previamente para la variedad Arbequina de la cosecha 2014-2015 así como en otros lotes del 2015-2016 (Moreno-González *et al.*, 2020b). Así, en estos análisis se obtuvieron unas concentraciones aproximadas de triterpenos pentacíclicos de 3,2 g/kg desglosados como $2,46 \pm 0,05$ g/kg de ácido maslínico, $0,77 \pm 0,01$ g/kg de ácido oleanólico y $0,011 \pm 0,001$ g/kg de eritrodiol (Moreno-González *et al.*, 2020b). Estos resultados permiten afirmar que las concentraciones de triterpenos pentacíclicos son bastante estables entre cosechas y lotes en la variedad Arbequina analizada. Al comparar los resultados de los triterpenos pentacíclicos de la variedad Arbequina con otras variedades, por ejemplo, la Empeltre y Marfil, se han encontrado que la variedad Marfil mantenía unas concentraciones similares de triterpenos con valores totales de 3,20 g/kg (Giménez *et al.*, 2015) mientras que en la variedad Empeltre los resultados fueron menores al ser de aproximadamente 2,50 g/kg (Moreno-González *et al.*, 2020b). También, se puede constatar que, si bien el ácido maslínico es el triterpeno mayoritario en las tres variedades, sus concentraciones oscilan entre ellas. La variedad con mayor cantidad de ácido maslínico es la Arbequina, y si se analiza el porcentaje de cada triterpeno, se puede indicar que en esta variedad es de aproximadamente un 73% del total de triterpenos y se mantiene entre cosechas y lotes analizados. En cambio, la variedad Marfil es la que presenta una cantidad menor de ácido maslínico (55%) y el ácido oleanólico incrementa (44%) (Giménez *et al.*, 2015). En común para todas las variedades analizadas es que el eritrodiol se encuentra en una proporción del 1%.

Cabe destacar que las aceitunas Arbequina empleadas en la presente tesis se elaboraron siguiendo un proceso de fermentación natural en salmuera, al igual que las variedades Empeltre y Marfil analizadas previamente (Moreno-González *et al.*, 2020b). Es importante tener en cuenta como se han elaborado las aceitunas ya que afectará a la concentración final de triterpenos pentacíclicos tal como describe Alexandraki *et al.*, (2014) para Conservolea y Kalamata. La fermentación natural no influye en la concentración final de los ácidos maslínico y oleanólico, mientras que en las aceitunas que siguen una elaboración de tipo español, en el que se utilizan soluciones de NaOH, se observó una disminución en el contenido en ácidos triterpénicos (Alexandraki *et al.*, 2014). En consecuencia, los valores obtenidos en aceitunas Arbequina procesadas mediante fermentación natural mantienen concentraciones

similares a las observadas en la aceituna sin tratar, tal como se ha reportado para la fruta cruda, donde se observan valores que oscilan entre 2,40 y 3,10 g/kg de ácidos triterpénicos (Guinda *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2017) Nuestros resultados también son consistentes con los descritos para otras variedades, como Manzanilla (2,10 mg/kg), Leccino (2,18 mg/kg), Cellina di Nardo (2,48 mg/kg), Hojiblanca (3,00 mg/kg), Conservolea (3,02 mg/kg) y Kalamata (3,28 mg/kg) (Durante *et al.*, 2018; García *et al.*, 2018). Por lo que se refiere a los alcoholes triterpénicos, es remarcable el hecho de que apenas han sido estudiados en aceitunas a pesar de que el eritrodiool también posee actividades biológicas (Juan *et al.*, 2020). El hecho de que los autores que analizan ácidos terpénicos, no detecten eritrodiool podría atribuirse al uso métodos de análisis que incluyen detectores poco sensibles, como son el LC-DAD (Durante *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2017) o GC-FID (Guinda *et al.*, 2010). Además, hay que indicar que los métodos de extracción utilizados por estos autores no fueron validados para el eritrodiool. Por ello es remarcable que el método de extracción y las condiciones LC-APCI-MS que utilizamos permitieron la detección de eritrodiool en cantidades que oscilaron entre 10,40 y 20,08 mg/kg para ambas cosechas.

El análisis de la composición de las aceitunas en compuestos bioactivos se completó con la determinación de los polifenoles en Arbequinas pertenecientes a la cosecha 2016-2017. Este grupo de compuestos, a pesar de ser más numeroso que los triterpenos, ya que se determinaron 15 polifenoles, tuvieron una concentración total inferior con un valor total de aproximadamente 1 g/kg. Dentro de ellos, el hidroxitirosol ($0,48 \pm 0,01$ g/kg), el verbascósido ($0,33 \pm 0,03$ g/kg) y la luteolina ($0,090 \pm 0,003$ g/kg) fueron los más abundantes, siendo cada uno de ellos aproximadamente un 45,5%; 32,0% y 8,6% respecto del total. Aunque se determinaron 12 polifenoles más, estos representaron únicamente un 13,9% de todos los compuestos de este grupo. El hidroxitirosol acetato, la rutina y el tirosol, se encontraron en porcentajes de aproximadamente 2% para cada uno de ellos. La salidroside, la oleuropeína y la luteolina-7-*O*-glucosido se encontraron en aproximadamente un 1%. Con porcentajes inferiores al 1% se encontraron, la quercetina, el ácido *p*-cumárico, el ácido caféico, la apigenina y el ácido vanílico. Si se comparan estos valores con los obtenidos previamente para la misma variedad, pero para cosechas anteriores, se puede observar que en la recolectada en 2014-2015, la cantidad total también fue similar al obtener un valor de 1 g/kg (Moreno-González *et al.*, 2020b). Es importante destacar que la distribución de polifenoles fue idéntica, ya que el hidroxitirosol, el verbascósido y la luteolina representaron el 85% del total. Sin embargo, la cosecha del 2015-2016, proporcionó una cantidad inferior al encontrarse 0,67 g/kg (Moreno-González *et al.*, 2020b). Al analizar las concentraciones obtenidas para cada uno de los polifenoles, se pudo constatar como el hidroxitirosol ($0,48 \pm 0,03$ g/kg) y la luteolina ($0,074 \pm 0,004$ g/kg) mantenían concentraciones similares a las de otras añadas (Moreno-González *et al.*, 2020b). Sin embargo, al observar el verbascósido se pudo comprobar

Discusión

como los valores de $0,016 \pm 0,0002$ g/kg eran muy inferiores a las obtenidas en las cosechas 2014-2015 o 2016-2017 que eran del orden de 0,33 g/kg. En aceitunas de la variedad Empeltre cosechadas en 2015-2016, se encontró también que los polifenoles totales tenían una concentración final de aproximadamente 1 g/kg (Moreno-González *et al.*, 2020b). En este caso se observó una distribución de polifenoles muy parecida a la descrita en este estudio para las Arbequinas cosechadas en el 2016-2017, lo que confirma que el hidroxitirosol, el verbascósido y la luteolina son los compuestos mayoritarios en el fruto procesado de *Olea europaea* L. En cambio, en aceitunas Marfil, aunque también los polifenoles totales fueron de aproximadamente 1 g/kg, la distribución fue diferente (Moreno-González *et al.*, 2020a). El hidroxitirosol ($0,4 \pm 0,08$ g/kg) fue el componente mayoritario, sin embargo, en segundo lugar, se encontró el tirosol ($0,2 \pm 0,02$ g/kg), en tercer lugar, la luteolina ($0,09 \pm 0,003$ g/kg), y el verbascósido fue encontrado en concentraciones muy bajas, ya que no excedió de 1 mg/kg (Moreno-González *et al.*, 2020a). Los diferentes resultados permiten constatar que el hidroxitirosol es el polifenol mayoritario, independientemente de la cosecha y la variedad, la luteolina presenta también concentraciones muy parecidas, y en cambio el verbascósido oscila incluso dentro de la misma variedad, aunque puede alcanzar concentraciones relativamente importantes en las aceitunas, tal como se ha podido constatar en la presente tesis.

Al analizar las concentraciones de polifenoles encontradas en las aceitunas y compararlas con las descritas en la literatura, hay que tener en cuenta el tipo de procesado, al igual que se ha descrito para los triterpenos. Las aceitunas crudas tienen que ser elaboradas para eliminar el amargor que se asocia a los secoiridoides, proceso que afecta al perfil de polifenoles del producto final. Aunque la elaboración de las aceitunas mediante fermentación natural retiene más polifenoles que los estilos español o californiano (Boskou, 2017; D'Antuono *et al.*, 2018), en general, se produce una hidrólisis de glucósidos, disminuyendo el contenido en oleuropeína, ligstrósido y verbascósido, así como de los glucósidos de hidroxitirosol y tirosol. En consecuencia, el procesado conduce a un incremento en el contenido de las agliconas (Boskou, 2017). Asimismo, los polifenoles son compuestos hidrosolubles, que difunden rápidamente en la salmuera, por lo que el contenido de estas moléculas no solo está influenciado por el tipo de tratamiento sino también por el número de lavados aplicados al fruto (Romero *et al.*, 2004; Boskou, 2017). Teniendo en cuenta estas consideraciones cabe destacar que los resultados obtenidos están en concordancia con los indicados para otras variedades tratadas siguiendo un procesamiento de fermentación natural, como Cellina de Nardo (2,2 g/kg), Bella di Cerignola (0,61 g/kg), Termite di Bitetto (0,35 g/kg) (D'Antuono *et al.*, 2018) o Manzanilla (1,20 g/kg) (Romero *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten reafirmar a la aceituna como un alimento rico en compuestos bioactivos. Con referencia a los polifenoles, su importancia radica no solo en el aporte total de dichos compuestos sino especialmente en su aporte en hidroxitirosol y derivados, como el tirosol y la oleuropeína, tal como se describe en la declaración de salud cardiovascular establecida por la EFSA (Reg. UE n. 432/2012). La declaración reconoce que el consumo diario de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (oleuropeína y tirosol) por 20 g de aceite de oliva contribuye a la protección de los lípidos en sangre del estrés oxidativo (Reg. UE n. 432/2012). Las aceitunas de la variedad Arbequina de la cosecha 2016-2017, presentaron un peso de $1,52 \pm 0,02$ g ($n = 371$), el peso del hueso fue de $0,42 \pm 0,01$ g ($n = 371$), por lo que el peso de la parte comestible de la aceituna fue de $1,10 \pm 0,01$ g ($n = 371$). Si se consideran los resultados obtenidos para el hidroxitirosol, tirosol y la oleuropeína, se puede indicar que el consumo de 9 aceitunas proporciona la cantidad de polifenoles señalados en la declaración de propiedades saludables. Además, si se tienen en cuenta el contenido en triterpenos pentacíclicos y se hace un promedio de las concentraciones obtenidas en las dos cosechas, los resultados permiten indicar que el consumo de sólo 9 aceitunas Arbequina proporciona aproximadamente 28, 10 y 0,2 mg de ácidos maslínico, oleanólico y eritrodiol. Por ende, los presentes resultados confirman a las aceitunas como una fuente importante de compuestos bioactivos. Por un lado, es un alimento que proporciona compuestos que tienen una distribución limitada, como ocurre para el hidroxitirosol y el tirosol que se han descrito únicamente en *Olea europaea* L. y *Vitis vinifera* L. (Karković Marković *et al.*, 2019; Rocha *et al.*, 2020) o el verbascósido que aparte de las aceitunas solo se ha identificado en la verbena que se utiliza como infusión (Alipieva *et al.*, 2014; Di Giancamillo *et al.*, 2015). En el caso de los triterpenos pentacíclicos, dichos compuestos están más ampliamente distribuidos en el mundo vegetal, y los ácidos maslínico y oleanólico se pueden encontrar en alimentos consumidos de forma habitual si se sigue una dieta rica en frutas y verduras. Así, la ingesta de una ración (125 g) de lentejas (Kalogeropoulos *et al.*, 2010), garbanzos (Kalogeropoulos *et al.*, 2010), berenjenas (Lin *et al.*, 2011) y espinacas (Lin *et al.*, 2011) proporcionaría 4,9; 7,7; 8,4 y 14,2 mg de ácido maslínico, mientras que de ácido oleanólico serían, 0,66; 0,45; 5,3 y 18,2 mg. Por lo que el consumo de una dieta variada si bien puede aportar una cantidad elevada de ácidos maslínico y oleanólico, el consumo de sólo 9 aceitunas Arbequina puede fácilmente superar el obtenido a partir de la ingesta de frutas y verduras, sobre todo para el ácido maslínico.

En el segundo objetivo de la presente memoria se abordó el análisis de las concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos seguido por la estimación de los principales parámetros farmacocinéticos después de la ingesta de aceitunas en ratas Sprague-Dawley. Diferentes estudios experimentales han permitido demostrar que los triterpenos pentacíclicos tienen propiedades cardioprotectoras, antiinflamatorias, antidiabéticas, neuroprotectoras y antitumorales entre otras (Juan

Discusión

et al., 2020). A pesar de los potenciales efectos beneficiosos para la salud, no existen estudios que evalúen la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los triterpenos en animales de experimentación o en humanos después de la ingesta de aceitunas. Aunque las concentraciones plasmáticas de ácido oleanólico (Buckland *et al.*, 2017) y de ácido maslínico y oleanólico en plasma y orina (Pozo *et al.*, 2017; De la Torre *et al.*, 2020) se han evaluado después de la ingesta de aceite de oliva en voluntarios sanos, los resultados obtenidos en aceite de oliva no pueden extrapolarse al consumo de aceitunas, debido a la diferente matriz alimentaria, lo que implica una diferente bioaccesibilidad que puede dar lugar a una biodisponibilidad oral diferente. Por lo tanto, se planteó el análisis de las concentraciones plasmáticas de triterpenos en ratas Sprague-Dawley después de la administración de aceitunas Arbequina.

El análisis de las concentraciones plasmáticas se llevó a cabo empleando un método analítico que permitía el análisis simultáneo de los principales triterpenos pentacíclicos presentes en *Olea europaea* L. Este método fue puesto a punto anteriormente (Giménez *et al.*, 2017), pero fue adaptado para permitir la determinación de polifenoles en la misma muestra de plasma (Kundisova *et al.*, 2020) y triterpenos pentacíclicos. Aunque la extracción de ambos grupos de compuestos del plasma se realiza de forma simultánea, el análisis cromatográfico es diferente, ya que los polifenoles requieren un LC-ESI-MS/MS (Kundisova *et al.*, 2020), mientras que los triterpenos se analizan por LC-APCI-MS. Por este motivo, antes de iniciar el experimento se realizó una validación del método de extracción, siguiendo las recomendaciones de la EMA (2011). La recuperación y el efecto matriz se evaluaron a las concentraciones de 25 y 100 nM empleando estándares de calibración preparados en plasma de ratas que no habían recibido aceitunas. La recuperación, normalizada por el estándar interno, fue superior al 95% para los 5 triterpenos pentacíclicos analizados y las dos concentraciones analizadas. En referencia al efecto matriz, se puede afirmar que no existe ya que los resultados dieron valores de aproximadamente 100% para los analitos evaluados. Este resultado indica que la competencia en la ionización entre el analito y los compuestos endógenos que coeluyen fue insignificante, o que las interferencias de los componentes de la matriz fueron eliminadas por el proceso de extracción de la muestra y el método LC-APCI-MS es robusto. La precisión y la exactitud también se valoraron en el rango de aplicación del método analítico que fue de 10 a 150 nM, empleando también estándares de calibración preparados en plasma blanco de rata. Los resultados obtenidos para estos dos parámetros fueron inferiores al 15%, lo que indica que las condiciones analíticas son precisas y exactas. Con relación a la sensibilidad del método de extracción, es remarcable el LOQ obtenido para los ácidos maslínico y oleanólico que fue de 0,18 y 0,28 nM, respectivamente. El valor más elevado se encontró para el uvaol que fue de aproximadamente 6 nM. Finalmente, hay que indicar que el método es selectivo, ya que el análisis del plasma blanco de rata no reveló picos cromatográficos en los tiempos

de retención de los triterpenos pentacíclicos. En conjunto se puede afirmar que los resultados obtenidos en la validación del método de extracción indican una elevada recuperación, ausencia de efecto matriz, linealidad, presión y exactitud adecuadas y selectividad, lo que asegura el análisis de las muestras de plasma de los animales.

En comparación con los otros métodos reportados hasta ahora para el análisis de compuestos triterpénicos en plasma (Jeong *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Pozo *et al.*, 2017), el método aquí descrito presenta algunas ventajas. En primer lugar, la extracción de analitos del plasma es relativamente rápida, ya que se realiza mediante un proceso líquido-líquido con acetato de etilo que es un solvente que permite una rápida evaporación a sequedad. Asimismo, el hecho de que los triterpenos pentacíclicos se determinen mediante inyección directa por LC-APCI-MS, evita la etapa de derivatización requerida cuando estos compuestos se detectan mediante cromatografía de gases o con algunos detectores utilizados en cromatografía líquida de alta resolución. Pero la ventaja más relevante del método consiste en que permite detectar no solo los triterpenos ácidos sino también los alcoholes, ambos con recuperaciones en torno al 100% y sin efecto matriz, mientras que los métodos publicados son capaces de determinar solo los ácidos triterpénicos (Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Pozo *et al.*, 2017). Además, el LOQ fue adecuado ya que varió desde 0,18 nM para el ácido maslínico hasta 6 nM para uvaol, proporcionando así una sensibilidad similar (Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015) o mayor (Xia *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016; Pozo *et al.*, 2017) en comparación con los métodos publicados. Por tanto, la metodología validada es adecuada para poder realizar el estudio farmacocinético.

Una vez validado el método analítico, se administraron a las ratas Sprague-Dawley las aceitunas a las dosis de 3,85 g/kg y 7,7 g/kg. Las dosis administradas equivalen al consumo de 60 y 120 aceitunas Arbequina por una persona y se ha calculado siguiendo el método de normalización de la superficie corporal sugerido por Reagan-Shaw *et al.*, (2008). Si se tiene en cuenta que las aceitunas suministradas a las ratas pertenecían a la cosecha de 2015-2016 y tenían una cantidad de triterpenos totales de 3,9 g/kg, los animales recibieron 15,2 mg triterpenos/kg y 30,4 mg triterpenos/kg para las dos dosis. Considerando los pesos de las ratas, se puede indicar que cada animal recibió 3,07 mg de ácido maslínico, 1,10 mg de ácido oleanólico y 0,08 mg de eritrodiol, en la dosis inferior. Y aunque las cantidades se doblaran en la dosis superior, en ambos casos se mantuvieron dentro de un rango nutricional.

Cuando se analizaron las concentraciones plasmáticas de los triterpenos en los animales obtenidas a las 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; y 8 horas, solo se encontraron los ácidos maslínico y oleanólico en ambas dosis y a todos los tiempos analizados. En ninguna de las muestras de sangre extraídas se encontró eritrodiol,

Discusión

aunque no es de extrañar dada su baja concentración en aceitunas donde representó el 1% de todos los triterpenos. El ácido maslínico es el triterpeno más abundante en el fruto de *Olea europaea* L, y es el compuesto que se encontró en mayor concentración en plasma. Los animales recibieron 11,1 mg/kg y 22,2 mg/kg de ácido maslínico con las dosis equivalentes al consumo de 30 y 60 aceitunas respectivamente. En ambas dosis se pudo observar como este compuesto ya se encontraba en sangre a los 30 min, sin embargo, su absorción fue lenta ya que la T_{max} se encontró a las 6 horas, con concentraciones máximas de $52,6 \pm 3,74$ nM a la dosis inferior que fue el doble en la dosis superior. Para este compuesto no se pudieron calcular de forma adecuada los parámetros de eliminación, ya que el último punto en el que se extrajo sangre fue a las 8 horas y faltaron tiempos de extracción en la fase de eliminación. Se han comparado los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos anteriormente en el grupo de investigación para el ácido maslínico administrado a ratas Sprague-Dawley (Sánchez-González *et al.*, 2014). En este estudio se analizó el ácido maslínico puro, por lo que se pudo realizar su administración endovenosa a la dosis de 1 mg/kg disuelto en (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (20%, w/v) con NaCl (0,9%). La biodisponibilidad obtenida para el ácido maslínico puro administrado por vía oral a la dosis de 50 mg/kg y solubilizado en (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (40%, w/v) con carboximetilcelulosa sódica (0,5%, w/v) fue del 5,13% obtenida mediante un análisis compartimental (Sánchez-González *et al.*, 2014). Dado que el compuesto se administraba en una solución de ciclodextrina, la T_{max} se obtuvo 30 min después de la administración oral con una C_{max} de 4,03 μ M y un tiempo de residencia medio de 4 horas. Por ello, los resultados obtenidos anteriormente (Sánchez-González *et al.*, 2014) constatan la importancia de estudiar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos después de la ingesta del alimento que lo contiene dada la diferencia que se observa entre la T_{max} y C_{max} del ácido maslínico puro y el encontrado en la presente memoria en el que el compuesto se encuentra en una matriz alimentaria. En este sentido, y corroborando los resultados obtenidos en la presente tesis, el estudio de la farmacocinética del ácido maslínico presente en el fruto de *Ziziphus jujuba* Mill. que se utiliza tanto como alimento como en la medicina tradicional china, mostró una T_{max} de $6,5 \pm 1$ horas en ratas Sprague-Dawley (Li *et al.*, 2018). Los autores sugieren que la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los ácidos triterpénicos podrían haber sido afectados por la matriz, así como por otros componentes presentes en el fruto, tales como flavonoides y polisacáridos (Li *et al.*, 2018). Existen en la literatura dos estudios que también evalúan la farmacocinética del ácido maslínico después de la administración de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional china en ratón (Chen *et al.*, 2012) y rata (Li *et al.*, 2015). La T_{max} obtenida después de la administración de un extracto de *Salvia miltiorrhiza* a ratones fue de 90 min (Chen *et al.*, 2012). Sin embargo, la administración de las hojas secas de *Eriobotrya japonica* (Thunb.) a ratas Sprague-Dawley mostró una T_{max} para el ácido maslínico de $3,02 \pm 0,03$ horas.

El estudio farmacocinético del ácido maslínico se completó con el análisis de los metabolitos mediante una aproximación de metabolómica dirigida. Los compuestos bioactivos que provienen de la dieta como los triterpenos pentacíclicos una vez en el organismo son considerados como xenobióticos pudiendo sufrir reacciones de biotransformación de fase I y fase II. Las reacciones de fase I se basan en oxidaciones, reducciones e hidrólisis, siendo la reacción principal la hidroxilación catalizada por diversas monooxigenasas conocidas como citocromos P450. Las reacciones de fase II, se basan en glucuronización, sulfatación, metilaciones, acetilaciones y conjugaciones con glutatión (Holcapek *et al.*, 2008). Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación permitió establecer que después de la administración oral de la dosis de ácido maslínico de 50 mg/kg a ratas Sprague-Dawley este compuesto se metabolizaba en plasma dando lugar únicamente a metabolitos de fase I (Sánchez-González *et al.*, 2015). El análisis de las muestras de plasma obtenidas 45 minutos después de la administración del ácido maslínico permitió la identificación por LC-LTQ-Orbitrap-MS de 7 derivados: 4 metabolitos monohidroxilados (m/z 487,3), 1 metabolito monhidroxilado y deshidrogenado (m/z 485,3) y 2 metabolitos dihidroxilados y deshidrogenados (m/z 501,3) (Sánchez-González *et al.*, 2015). Con base a estos resultados, se investigó no solo la presencia de estos compuestos, sino también la del derivado dihidroxilado (m/z 503,3) para completar el estudio de los metabolitos de fase I. Además, se incluyeron biotransformaciones derivadas de reacciones de fase II como son la adición al ácido maslínico de glucurónido (m/z 647,3) o sulfato (m/z 551,3). También se consideró la posibilidad que la conjugación tuviese lugar sobre los productos obtenidos en la fase I. Por este motivo se buscaron las masas correspondientes al ácido maslínico monohidroxilado al que se le hubiesen adicionado un ácido glucurónido (m/z 663,3) o sulfato (m/z 567,3) así como la del ácido maslínico monohidroxilado y deshidrogenado conjugado con ácido glucurónido (m/z 661,3) o sulfato (m/z 465,3). El análisis de las muestras de plasma obtenidas después de la administración de la dosis superior de 7,7 g/kg de aceitunas Arbequina a ratas permitió determinar 9 metabolitos: 4 metabolitos monohidroxilados (m/z 487,3; MMA1a-d), 1 metabolito monhidroxilado y deshidrogenado (m/z 485,3; MMA2), 2 metabolitos dihidroxilados (m/z 503,3; MMA3a-b), 1 metabolito dihidroxilado y deshidrogenado (m/z 501,3; MMA4) y un metabolito monohidroxilado y deshidrogenado con adición de un ácido glucurónico (m/z 661,3; MMA5). Hay que destacar que los derivados MMA1d y MMA2 solo fueron determinados a la dosis de 7,7 g/kg y los pocos resultados obtenidos para el MMA2 no permitieron estimar sus parámetros farmacocinéticos.

La estimación de las AUC para el ácido maslínico y sus metabolitos en ambas dosis de aceitunas, han permitido establecer que el compuesto mayoritario en plasma es el ácido maslínico ya que su AUC representa aproximadamente un 60% respecto al total. El derivado más abundante fue el metabolito dihidroxilado y deshidrogenado (MMA4) con un AUC del 21%, seguido por los derivados

Discusión

monohidroxilados (MMA1a-d) que en total presentaron un AUC del 15%. Cabe destacar que el MMA1c, es el más abundante de entre los 4 isómeros representando un 8% del total. Finalmente, el derivado MMA5 alcanzó un 3% y los metabolitos MMA3a-b solo se encontraron en un 1%. Si se analizan las T_{max} , se puede observar cómo mayoritariamente se encuentran entre 1 y 2 horas después de la ingesta de aceitunas, indicando su rápida formación en el organismo. El único metabolito que presentó una T_{max} posterior fue el monohidroxilado MMA1c con un valor cercano a las 5 horas. En cuanto a la eliminación de estos compuestos biotransformados del organismo, también se puede observar un cierto comportamiento similar entre ellos. El tiempo medio de residencia fue de aproximadamente 4 horas para MMA1a; MMA1b y MMA4 mientras que se alargó hasta las 6 horas para MMA1c; MMA3a; MMA3b y MMA5.

El ácido oleanólico fue administrado a las ratas Sprague-Dawley a 4 mg/kg y 8 mg/kg para las dosis equivalentes al consumo en humanos de 30 y 60 aceitunas. El análisis de las concentraciones plasmáticas mostró que este compuesto se encontró desde los 30 minutos hasta las 8 horas. La estimación de los parámetros farmacocinéticos a partir de las concentraciones plasmáticas permitió establecer que este compuesto presentaba una T_{max} similar a la observada para el ácido maslínico y que fue de aproximadamente 6 horas. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas para el ácido oleanólico fueron menores, con una C_{max} de 11 nM a la dosis superior. El tiempo medio de residencia para el ácido oleanólico fue estimado sobre las 11h. A diferencia del ácido maslínico del que apenas existen estudios farmacocinéticos, el ácido oleanólico ha sido más investigado. Esta divergencia entre el número de artículos publicados para estos dos compuestos tan similares puede atribuirse al hecho de que el ácido oleanólico se encuentra en plantas medicinales utilizadas tradicionalmente en la medicina china para el tratamiento de trastornos hepáticos en humanos debido a sus efectos hepatoprotectores (Lin *et al.*, 2016). De hecho, este compuesto se ha utilizado como fármaco hepatoprotector de venta libre en China durante décadas (Lin *et al.*, 2016). Además de la actividad hepatoprotectora, se han atribuido al ácido oleanólico diversas actividades biológicas, que incluyen efectos anticancerígenos, antiosteoporosis, antiobesidad, anti diabéticos, antiinflamatorios, inmunorreguladores y antioxidantes (Lin *et al.*, 2016). Por estos motivos hay diferentes estudios que evalúan la farmacocinética de este compuesto en ratas (Jeong *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). El estudio farmacocinético más completo fue desarrollado por Jeong *et al.*, (2007) que administró este compuesto a ratas por vía oral e intravenosa a las dosis de 25 y 50 mg/kg constatando su baja biodisponibilidad que se estimó en un 0,7%. Con referencia a la T_{max} para el ácido oleanólico este compuesto dio valores de entre 30 minutos y 1 hora (Jeong *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016) excepto tras la administración de las hojas secas de *Eriobotrya japonica* (Thunb.) en que mostró valores cercanos a las 3 horas (Li *et al.*, 2015).

Los metabolitos del ácido oleanólico también se buscaron siguiendo una aproximación de metabolómica dirigida. En este caso, únicamente se investigaron tres tipos diferentes de metabolitos, el derivado monohidroxiado (m/z 471,5), el derivado monohidroxiado y deshidrogenado (m/z 469,5) y el conjugado con sulfato (m/z 535,5). El análisis de las muestras de plasma permitió identificar 5 metabolitos: 3 isómeros monohidroxiados (m/z 471,5; MOA1a-c) y 2 isómeros conjugados con sulfato (m/z 535,5; MOA2a-b). Las concentraciones plasmáticas de los metabolitos permitieron la estimación de las constantes farmacocinéticas. Así, las AUC obtenidas permitieron establecer que el metabolito monohidroxiado MOA1 fue el mayoritario para ambas dosis y representó un 70% de los compuestos, mientras que los otros dos isómeros monohidroxiados solo fueron un 3%. Los sulfatos del ácido oleanólico (MOA2a-b) se encontraron en plasma en un 10%. Este extenso metabolismo explica, en parte, las bajas concentraciones plasmáticas obtenidas ya que la AUC para el compuesto padre fue solo un 17% del total de los compuestos. En cuanto a la T_{max} de los metabolitos, a diferencia del ácido maslínico que se formaron rápidamente, para los derivados del oleanólico se encontraron mayoritariamente entre las 3 y las 6 horas. El hecho que la hidroxilación sea una de las principales vías metabólicas para el ácido oleanólico, se ha confirmado en resultados obtenidos en otros estudios (Jeong *et al.*, 2007).

El tercer objetivo de la presente tesis consistió en evaluar los efectos de la ingesta de las aceitunas Arbequina sobre la presión arterial (PA). Para ellos se empleó un modelo animal ampliamente usado en estudios fisiológicos relacionados con la hipertensión. Se utilizaron ratas WKY para evaluar el efecto en ratas normotensas, mientras que la cepa SHR se empleó como un modelo animal adecuado de hipertensión primaria (Lin *et al.*, 2016). Este modelo tiene similitudes con el desarrollo de la hipertensión esencial humana que comprende una susceptibilidad genética a la PA elevada sin una etiología específica y que representa el 90-95% de los casos humanos adultos (Lerman *et al.*, 2019). Cuando los animales tuvieron 12 semanas de edad, la PA sistólica fue de $200 \pm 3,9$ mm Hg ($n = 15$) y la diastólica de $159 \pm 1,1$ mm Hg ($n = 15$), lo que demuestra que las ratas SHR padecían hipertensión, mientras que las ratas WKY presentaban una presión sistólica clasificada como normotensión ($141 \pm 1,7$ mm Hg; $n = 13$) y valores diastólicos ($97 \pm 1,9$ mm Hg; $n = 13$). Estos valores concuerdan con los reportados para ambas cepas a esta edad (Maris *et al.*, 2005).

En primer lugar, se realizó un estudio agudo para obtener información sobre los efectos de las aceitunas Arbequina sobre la PA en poco tiempo. Nuestros resultados mostraron que la administración única no modificó ni la PA sistólica ni la diastólica en animales normotensos. Sin embargo, las aceitunas ejercieron un efecto antihipertensivo en ratas SHR en comparación con los controles SHR que no ingirieron dicho alimento que fue observable desde la segunda hora hasta las 10 horas post-

Discusión

administración, con una disminución de $14,9 \pm 1,7$ mm Hg ($n = 37$) y $15,8 \pm 1,8$ mm Hg ($n = 37$) en la PA sistólica y diastólica. No existen estudios en la literatura que muestren el efecto agudo de derivados de *Olea europaea* L. en un modelo animal de hipertensión. Sin embargo, Terés *et al.* (2008) administraron una dosis única de 2 g/kg de aceite de oliva virgen a ratas Sprague-Dawley y encontraron una reducción de la PA a las 2 y 4 horas posteriores a la administración. Esta acción reductora de la PA se atribuyó a la alta concentración de ácido oleico que procede a través de un mecanismo de acción basado en la rápida regulación de la estructura lipídica de la membrana y la señalización celular en las células vasculares (Terés *et al.*, 2008).

Para profundizar en el tema se realizó un estudio crónico a lo largo de 7 semanas donde encontramos un descenso de la PA sistólica de $15,6 \pm 2,2$ mm Hg ($n = 45$) respecto al control. Además, la PA diastólica descendió $13,7 \pm 1,9$ mm Hg ($n = 45$) desde la segunda semana hasta el final del experimento. Por tanto, la ingesta de una dosis equivalente a un consumo humano de 30 aceitunas Arbequinas no modificó la PA en las ratas normotensas WKY y provocó un efecto antihipertensivo en las SHR, tanto en experimentos agudos como crónicos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro estudio podrían ser relevantes para la salud humana, ya que se ha descrito que una reducción relativamente pequeña de la PA sistólica (10 mm Hg) redujo significativamente el riesgo de eventos de enfermedad cardiovascular mayor, enfermedad coronaria, ictus e insuficiencia cardíaca (Ettihad *et al.*, 2015). Sin embargo, la compleja composición de las aceitunas dificulta el esclarecimiento de los mecanismos implicados en la mejora de la PA observada en ratas SHR, así como para atribuir la actividad a un componente en particular. Otros estudios realizados en el mismo modelo experimental también han mostrado un efecto antihipertensivo utilizando diferentes derivados de *Olea europaea* L. (Terés *et al.*, 2008; Valero-Muñoz *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2016; Vázquez *et al.*, 2019). Entre los componentes hipotensores destacados por estos autores destacan el ácido oleico, los polifenoles y los triterpenos pentacíclicos. El papel del ácido oleico ha sido señalado por Terés *et al.* (2008) tras la administración de 2 g/kg de aceite de oliva virgen cada 12 horas durante 14 días. Se observó una reducción significativa y progresiva de la PA sistólica en ratas SHR tan pronto como 4 días después del inicio del tratamiento. Se ha descrito que el ácido oleico provoca procesos de adaptación bastante rápidos que producen una mejora en la producción de mediadores vasodilatadores junto con una restricción de las vías de vasoconstricción que ceden a la actividad hipotensora observada (Terés *et al.*, 2008). Aunque el ácido oleico representa un 70-80% de los lípidos tanto en las aceitunas como en el aceite de oliva, el contenido de grasa en ambos alimentos es ligeramente diferente. Mientras que el aceite de oliva contiene un 99% de lípidos (Jiménez-López *et al.*, 2020), los valores bajan al 6-30% en las aceitunas (Rocha *et al.*, 2020). Dado que la variedad Arbequina contiene un 21,2% de grasa, la dosis de oleico administrada a ratas fue de 0,65 g/kg, un 80% menor a la administrada diariamente por Terés *et al.*, (2008) que correspondió

a 3,17 g/kg. Por tanto, la baja concentración de ácido oleico en las aceitunas difícilmente podría explicar la actividad antihipertensiva observada tras su ingestión, y posiblemente también podrían estar implicados otros compuestos menores. Vázquez *et al.* (2019) no pudieron encontrar un efecto hipotensor en el mismo modelo animal después de la administración durante 8 semanas de 1 ml/rata/día de un aceite de oliva virgen extra (AOVE) que contenía ácido oleico a una dosis de 1,98 mg/kg y un bajo contenido de polifenoles (17,6 mg/kg), aunque reportaron una disminución de los biomarcadores vasoconstrictores y un aumento de óxido nítrico vasodilatador. Sin embargo, el mismo aceite enriquecido con 750 mg/kg de compuestos fenólicos (principalmente hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol y oleuropeína) provocó una reducción progresiva de la PA sistólica en ratas SHR desde la 5ª semana hasta la 8ª semana, que se atribuyó a una mejora de la disfunción endotelial y una disminución del estado oxidativo (Vázquez *et al.*, 2019). Cabe mencionar que, en nuestras condiciones experimentales, las aceitunas impulsaron la actividad antihipertensiva en animales SHR ya en la 2ª semana, lo que implica un efecto más rápido que el observado con el AOVE enriquecido y podría estar en parte relacionado con el contenido en polifenoles. En nuestro estudio la variedad Arbequina contenía 1043 mg de polifenoles/kg aportando así una dosis de 4,01 mg/kg, que es el doble de la administrada con el aceite de oliva enriquecido que aproximadamente fue de 1,88 mg/kg (Vázquez *et al.*, 2019). Además, no se debe subestimar el contenido de triterpenos pentacíclicos, ya que las aceitunas Arbequinas contienen 3214 mg/kg. Por lo tanto, las ratas SHR recibieron una dosis de 12,4 mg/kg de estos compuestos bioactivos que también se había considerado que tenían una actividad antihipertensiva en el mismo modelo animal (Valero-Muñoz *et al.*, 2014). En este sentido, la administración durante 8 semanas a animales SHR de un aceite de orujo concentrado en ácidos triterpénicos que se les dio a una dosis de 100 mg/kg (56,8% de ácido oleanólico y 38% de ácido maslínico) no solo redujo la PA, sino que también mejoró la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial, mejoró la disfunción endotelial, así como disminuyó la expresión de mediadores inflamatorios y fibróticos en la aorta (Valero-Muñoz *et al.*, 2014). Aunque este estudio es relevante para demostrar los potenciales beneficios cardiovasculares de un aceite de orujo de oliva enriquecido en triterpenos pentacíclicos, la suplementación en ácidos maslínico y oleanólico se acerca más a un régimen farmacológico que a un patrón nutricional. Finalmente, la participación de compuestos bioactivos de *Olea europaea* L. en la reducción de la PA ha sido indicada por Romero *et al.* (2016). La administración a SHR durante 5 semanas de una dosis de 30 mg/kg de extracto de hoja de olivo que contiene oleuropeína (4,5 mg/kg), ácidos triterpénicos (3 mg/kg) e hidroxitirosol (0,3 mg/kg) disminuyó la PA sistólica a partir de la tercera a la quinta semana de tratamiento, en comparación con el control que solo recibió agua (Romero *et al.*, 2016). La atenuación de la PA alta en animales SHR se atribuyó a una mejora de la función vascular relacionada con la disminución de la inflamación y los marcadores oxidativos.

Discusión

Dado el papel que pueden jugar los triterpenos pentacíclicos y polifenoles en la disminución de la PA, estos compuestos se determinaron en el plasma extraído 15-17 horas después de la última administración que corresponde al intervalo de tiempo en el que se midió la PA. En este tiempo de muestreo, solo los principales compuestos bioactivos que se encuentran en las aceitunas se determinaron en el plasma. El ácido maslínico presente en las aceitunas a $2341 \pm 82,2$ mg/kg se cuantificó en plasma en cantidades bajas tanto en WKY ($3,13 \pm 0,85$ nM) como en SHR ($3,51 \pm 1,10$ nM). También se determinó en plasma el ácido oleanólico, el segundo triterpeno pentacíclico más abundante en aceitunas Arbequina ($862 \pm 44,0$ mg/kg) encontrándose en concentraciones de aproximadamente 1 nM. En relación con los polifenoles, en plasma solo se encontraron hidroxitirosol y luteolina en concentraciones inferiores a 1 nM, sin trazas de verbascoside que fue el segundo polifenol en abundancia detectado en las aceitunas. Por tanto, las aceitunas Arbequina no solo aportan ácido oleico, sino también una gran cantidad de fitoquímicos con actividad cardioprotectora que aún están presentes a las 15-17 horas después de su administración.

Finalmente, también se consideró el posible impacto del consumo regular de aceitunas en el peso corporal. El contenido energético de 100 g de porción comestible oscila entre 180 y 250 kcal (Rocha *et al.*, 2020) y en la Arbequina del presente estudio fueron 211 kcal, según el productor. En los grupos administrados con aceitunas la ingesta media diaria de Arbequinas en ambas cepas fue de $1,2 \pm 0,01$ g, lo que implica un aporte de $2,5 \pm 0,03$ kcal. La ingestión de alimentos fue similar en los animales WKY ($18,0 \pm 0,1$ g/día; $n = 13$) y SHR ($17,8 \pm 0,1$ g/día; $n = 15$) con una ingesta calórica media de $52,4 \pm 0,3$ kcal/día y $51,6 \pm 0,3$ kcal/día. Así, la administración oral diaria durante 49 días de una dosis equivalente al consumo humano de 30 Arbequinas, aunque incrementando las calorías en aproximadamente un 5% con respecto a los grupos control, no afectó el peso corporal final ni la tasa media de crecimiento, ni en animales normotensos (WKY) ni en ratas hipertensas (SHR). No hay datos en la literatura sobre los efectos de las aceitunas sobre el peso corporal, pero sí hay información sobre los subproductos de *Olea europaea* L. En este sentido, en la cepa SHR no se observaron diferencias en el peso corporal de los animales tratados con respecto al grupo control tras la administración oral de aceite de orujo de oliva concentrado en ácidos triterpénicos durante 8 semanas (Valero-Muñoz *et al.*, 2014) o extracto de hoja de olivo enriquecido con oleuropeína durante 5 semanas (Romero *et al.*, 2016). La administración oral durante 8 semanas de aceite de oliva virgen ($17,6$ mg/kg de polifenoles) a ratas SHR no indujo ningún cambio en el peso corporal con respecto al control SHR mientras que el aceite enriquecido con 750 mg/kg de polifenoles produjo una ligera disminución en peso corporal (Vázquez *et al.*, 2019). La administración oral durante 90 días de un extracto acuoso hidrolizado de pulpa de oliva a ratas Sprague Dawley a $1,0$ o $1,5$ g/kg no indujo ningún efecto sobre el peso corporal, excepto por la dosis de $2,0$ g/kg que provocó una pequeña disminución en machos y ratas hembra (Christian *et al.*, 2004). En otro

estudio, Poudyal *et al.* (2010) observaron que la ingesta de alimentos en ratas alimentadas con dieta control y dieta alta en carbohidratos y alta en grasas no se vio afectada por la suplementación con 3% de extracto de hoja de olivo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al desarrollar el tercer objetivo de la presente tesis, nuestro estudio demuestra que el consumo de aceitunas no modifica la PA en ratas normotensas mientras que en ratas hipertensas posee capacidad para contrarrestar la PA elevada, sin ganancia de peso en ambas cepas de ratas.

Una vez completados el estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos después del consumo de aceitunas y el efecto de la ingesta de este alimento sobre la presión arterial en modelos animales, se pasó a desarrollar la intervención nutricional, que abordó los mismos aspectos, pero en voluntarios sanos. Por ello, el cuarto objetivo de la presente tesis consistió en la evaluación de las concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en voluntarios sanos después del consumo de aceitunas. El estudio desarrollado en el CIM-Sant Pau consistió en una intervención nutricional de centro único, abierto, aleatorizado y cruzado de dos periodos (protocolo IIBSP-OLI-2016-23; registro en el ClinicalTrials.gov con ref. NCT03886597). En una primera fase se realizó el estudio farmacocinético de los triterpenos pentacíclicos después de la administración única a 18 voluntarios sanos que consumieron 60 o 120 aceitunas. La dosis se estableció considerando que la variedad Arbequina es de calibre pequeño y que en la cosecha 2016-2017 proporcionó un peso promedio de $1,52 \pm 0,02$ g ($n = 371$). La elevada homogeneidad en el peso de las aceitunas y del peso del hueso ($0,42 \pm 0,01$ g; $n = 371$) garantiza una uniformidad en la ingesta de la parte comestible. Teniendo en cuenta las características de estas aceitunas, al consumir 60 aceitunas los participantes ingerían aproximadamente 66 g de porción comestible. Existe un estudio que evalúa la farmacocinética de los polifenoles después del consumo de 20 aceitunas Kalamata, que, al ser de gran calibre, la cantidad de porción comestible que ingirieron los voluntarios fue de 100 g (Kountouri *et al.*, 2007). Por lo que 60 aceitunas comestibles proporcionan una cantidad suficiente de compuestos bioactivos para permitir su adecuada determinación en sangre en los diferentes tiempos experimentales. Los voluntarios también recibieron 120 aceitunas para poder valorar el efecto de la dosis en los diferentes parámetros farmacocinéticos. Teniendo en cuenta las concentraciones de triterpenos pentacíclicos encontradas para las aceitunas Arbequina de la añada 2016-2017, que fueron las utilizadas en la intervención nutricional, se puede indicar que los voluntarios que ingirieron 60 aceitunas consumieron, $155 \pm 1,65$ mg de ácido maslínico, $57,1 \pm 0,61$ mg de ácido oleanólico y únicamente $0,69 \pm 0,01$ mg de eritrodiol, representado un total de 213 mg de triterpenos.

Discusión

En la fase I de la intervención nutricional, después de la ingesta única de 60 o 120 aceitunas, se extrajo sangre en los siguientes tiempos de muestreo: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8 y 24 horas. Previo al análisis de las muestras de plasma se verificó el método utilizando estándares de calibración preparados en plasma humano blanco. Los resultados indicaron una adecuada precisión y exactitud, linealidad, elevada sensibilidad, selectividad y ausencia de *carry-over*. Una vez validado el método se analizaron las muestras de plasma que permitieron identificar, al igual que en plasma de rata, los ácidos maslínico y oleanólico sin detectar al eritrodiol.

El ácido maslínico se detectó en plasma desde los 30 minutos después del consumo de aceitunas hasta las 24 horas. La C_{\max} fue de aproximadamente 150 nM a las 4 horas para el consumo de 60 aceitunas, alcanzándose una C_{\max} de 391 nM a las 5 horas después de la ingesta de 120 aceitunas. En el estudio en rata la cantidad de aceitunas que recibieron fue calculada haciendo la traslación del consumo de 30 y 60 aceitunas en humanos. Merece la pena resaltar que la C_{\max} obtenida en rata para la dosis de 7,70 g/kg equivalente al consumo en humanos de 60 aceitunas fue de 111 nM, que se encuentra dentro del rango de concentraciones obtenidas en los voluntarios después de ingerir 60 Arbequinas. En el estudio en humanos se incluyeron tiempos de extracción más largos que permitieron caracterizar la fase de eliminación de este compuesto de forma correcta. Así, se puede comprobar como la eliminación es relativamente lenta, ya que la semivida o vida media ($t_{1/2}$) fue de aproximadamente 10 horas y el tiempo de residencia medio en el organismo de 15,4 horas.

Los metabolitos del ácido maslínico también se investigaron siguiendo la misma aproximación de metabolómica dirigida empleada en el plasma de rata. En los voluntarios sanos se observó un menor número de derivados, ya que únicamente se identificaron 3 metabolitos, que fueron todos resultado de reacciones de fase I. Así, los metabolitos que se encontraron fueron 1 metabolito monohidroxilado (m/z 487,3; MMA1), 1 metabolito monhidroxilado y deshidrogenado (m/z 485,3; MMA2), 1 metabolito dihidroxilado y deshidrogenado (m/z 501,3; MMA4). Al comparar los tiempos de retención observados entre los plasmas procedentes de rata o de los voluntarios, se puede constatar como el metabolito monohidroxilado encontrado en humanos coincidiría con el MMA1c encontrado en ratas, ya que en ambos casos los tiempos de retención son de aproximadamente 14 min. En cambio, las biotransformaciones observadas en los voluntarios para los derivados MMA2 y MMA4 corresponden a isómeros diferentes a los encontrados en los animales de experimentación.

Las concentraciones plasmáticas de los metabolitos fueron analizadas siguiendo una aproximación no compartimental, lo que permitió establecer las constantes farmacocinéticas. El análisis de la AUC obtenidas tanto para el ácido maslínico como para los 3 metabolitos encontrados indica que el compuesto mayoritario encontrado en el plasma de los voluntarios sanos fue el ácido maslínico al

representar un 85% del total de los compuestos. El metabolito monohidroxiado (MMA1) se encontró en un 10%, mientras que el monohidroxiado y deshidrogenado (MMA2) representó el 4% y el dihidroxiado y deshidrogenado (MMA4) el 2%. Al analizar las T_{max} para los metabolitos se puede observar como el MMA1 presenta un valor de aproximadamente 5 horas, y que es similar al observado para el mismo metabolito en rata (MMA1c). Los otros dos metabolitos también presentaron una T_{max} de aproximadamente 4 y 5 horas, lo que indica que se forman lentamente. Al disponer de más tiempos de extracción de sangre, se pudo caracterizar la fase de eliminación mejor que en la rata. Los metabolitos MMA1 y MMA2 presentaron una semivida de eliminación de aproximadamente 8 horas, mientras que el MMA4 se elimina más rápidamente del organismo con un tiempo de 4 horas. Con referencia al tiempo de residencia media en el organismo, también coinciden el MMA1 y MMA2 siendo aproximadamente de 13 horas, mientras que el MMA4 es de únicamente 8 horas. Es remarcable el hecho de que el ácido maslínico presenta una semivida y un tiempo de residencia medio superior que el de los metabolitos, lo que indica su lenta eliminación del organismo.

El ácido oleanólico fue detectado en plasma en todos los tiempos de extracción, presentado una C_{max} de 15 nM a las 4,4 horas después del consumo de 120 aceitunas. Como en el caso del ácido maslínico los valores de C_{max} observados en los voluntarios presentaban una correspondencia con los obtenidos en ratas para la dosis equivalente en humanos a 60 Arbequinas. Para el ácido oleanólico se encontró una C_{max} de 8 nM en los voluntarios después de ingerir 60 aceitunas, y en las ratas la C_{max} fue de 11 nM para la dosis de 7,7 g/kg. La semivida de eliminación fue de 8 horas y el tiempo de residencia medio fue de 12 horas. En referencia al posible metabolismo de este compuesto hay que indicar que se buscaron los mismos metabolitos que en la rata, que fueron solo tres tipos, el derivado monohidroxiado (m/z 471,5), el derivado monohidroxiado y deshidrogenado (m/z 469,5) y el conjugado con sulfato (m/z 535,5). No se encontró ninguno de ellos, por lo que en humanos si se forman metabolitos, es posible que sean derivados diferentes a los encontrados en la rata.

Los estudios sobre la biodisponibilidad de los ácidos maslínico y oleanólico en humanos utilizando cantidades dentro de un rango dietético se han visto obstaculizadas, primero por la falta de estándares comerciales del ácido maslínico, que no existían hasta hace relativamente poco años, así como por la falta de métodos analíticos que dispusieran de la sensibilidad y especificidad adecuadas. Actualmente sólo existen dos estudios farmacocinéticos en voluntarios, uno que analiza el ácido oleanólico (Song *et al.*, 2006) y otro que analiza los ácidos maslínico y oleanólico después de la ingesta de aceite de oliva (De la Torre *et al.*, 2020). El primer estudio analizó la farmacocinética del ácido oleanólico administrado en cápsulas a la dosis de 40 mg a 18 voluntarios chinos sanos (Song *et al.*, 2006). Los tiempos de extracción de las muestras fueron muy completos: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0;

Discusión

15,0; 24,0 y 48 horas, lo que permitió caracterizar adecuadamente la fase de eliminación de este compuesto. Las curvas de la concentración plasmática del ácido oleanólico-tiempo de la mayoría de los 18 sujetos fueron ajustadas a un modelo monocompartimental (Song *et al.*, 2006). Los parámetros farmacocinéticos descritos por estos autores son similares a los indicados en la presente memoria. Así, Song *et al.*, (2006) encontraron una T_{max} de 5,2 horas y una semivida de eliminación de 8,73 horas, que son similares a las obtenidas después del consumo de aceitunas que fueron de aproximadamente 4 horas para la T_{max} y de 8 horas para la $t_{1/2}$. Con referencia a la C_{max} , estos autores encuentran valores de 26,53 nM después de administrar 40 mg. En nuestro estudio, el consumo de 120 aceitunas que contenían 110 mg de ácido oleanólico proporcionó una C_{max} de 15 nM. Esta diferencia en la biodisponibilidad puede atribuirse al hecho de que al administrar el ácido oleanólico en cápsula, se evita el paso de liberación de la matriz alimentaria después de ser ingeridos, siendo más bioaccesibles para la absorción intestinal en los enterocitos (Rein *et al.*, 2012). En el segundo estudio, de la Torre *et al.*, (2020) analizan la farmacocinética de los ácidos maslínico y oleanólico después de la ingesta de aceites enriquecidos en estos compuestos. Por este motivo, los voluntarios ingieren 6 mg de ácido maslínico y 4,7 mg de ácido oleanólico en 30 mL de aceite de oliva. Al igual que sucede en la presente tesis, de la Torre *et al.*, (2020) encuentran una biodisponibilidad muy diferente entre el ácido maslínico y el oleanólico. Estos compuestos son estructuralmente muy parecidos, lo que podría presuponer que presentan una biodisponibilidad similar. Sin embargo, de la Torre *et al.*, (2020) encuentran que el ácido maslínico presenta una biodisponibilidad 7 veces superior a la del ácido oleanólico (calculada considerando el AUC y la C_{max}), aunque en la dosis administrada, el ácido maslínico es únicamente 1,3 veces superior a la del oleanólico. En la presente memoria se observa un patrón similar, ya que, aunque la cantidad de ácido maslínico administrada es 2,7 veces superior, se ha observado una diferencia en la biodisponibilidad siendo aproximadamente 30 veces superior. Los parámetros farmacocinéticos descritos por estos autores difieren ligeramente respecto a lo que se describe en la memoria, pero puede atribuirse a que administran los compuestos en aceite con lo que son más rápidamente bioaccesibles. Así la T_{max} para ambos compuestos es de 3 horas, con una C_{max} de 71 nM para el ácido maslínico y 11 nM para el ácido oleanólico, y con una $t_{1/2}$ de 2 horas. Las curvas de concentración plasmática para el ácido maslínico se ajustaron a un modelo bicompartimental (De la Torre *et al.*, 2020). En relación con el metabolismo, estos autores solo identifican la presencia de glucurónidos del ácido maslínico sin describir si existen metabolitos del ácido oleanólico (De la Torre *et al.*, 2020).

La fase II de la intervención nutricional consistió también en un ensayo de centro único, abierto, aleatorizado, cruzado, de dos periodos y régimen de administración diario con 40 voluntarios que consumieron durante 30 días, 60 aceitunas Arbequina, separadas en 2 tomas, 30 aceitunas se ingirieron con el almuerzo y 30 aceitunas se consumieron con la cena. En la fase II, se evaluaron las

concentraciones plasmáticas de los triterpenos pentacíclicos a los 15 y 30 días, observándose para en ambos tiempos de extracción concentraciones similares, siendo de aproximadamente 300 nM y 15 nM, para los ácidos maslínico y oleanólico, respectivamente. Si se comparan estos resultados con los obtenidos para estos triterpenos después de la ingesta única de 60 aceitunas, en que a las 24 horas las concentraciones plasmáticas fueron de 27 nM y 1,33 nM para los ácidos maslínico y oleanólico, respectivamente, se puede observar un notable incremento en las concentraciones plasmáticas. De la Torre *et al.*, (2020) estudiaron también el efecto del consumo repetido de aceite de oliva sobre las concentraciones plasmáticas a la semana y a las 3 semanas, encontrando también una acumulación de los ácidos maslínico y oleanólico, ya que las concentraciones plasmáticas fueron de 3 a 4 veces superiores que las obtenidas después de la administración única. Teniendo en cuenta la vida media y el tiempo de residencia medio en el organismo para dichos compuestos, estos autores sugieren que se alcanzaron concentraciones en estado estacionario después del consumo de las dosis repetidas (De la Torre *et al.*, 2020). En la presente memoria, y después del consumo repetido de aceitunas, el incremento en las concentraciones plasmáticas de los ácidos maslínico y oleanólico fue 11 veces superior al obtenido después del consumo de una dosis única, lo que sugiere que las aceitunas son una fuente importante de estos compuestos bioactivos.

El quinto objetivo de la tesis evaluó el efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina sobre la presión arterial y el peso corporal en voluntarios sanos, y se enmarca en la intervención nutricional previamente descrita (protocolo IIBSP-OLI-2016-23; registro en el ClinicalTrials.gov con ref. NCT03886597). Dado que la intervención consistía en 2 fases, en la fase I se evaluó el efecto del consumo de 60 o 120 aceitunas sobre la presión arterial, mientras que la fase II analizó el efecto de la ingesta repetida sobre esta variable, además de evaluar su efecto en el peso corporal. Las aceitunas se conservan en salmuera, lo que genera la preocupación de los consumidores sobre el efecto que puede tener la sal contenida en este alimento sobre la presión arterial. Según la información proporcionada por la Base de Datos Española de Composición de Alimentos, 100 g de aceitunas aportan 54 mg de sodio (BEDCA 2010). Los voluntarios asignados al grupo de 60 aceitunas consumieron aproximadamente 66 g de pulpa de aceitunas, mientras que los voluntarios asignados al grupo de 120 aceitunas ingirieron aproximadamente 128 g. Teniendo en cuenta esta información, el primer grupo de intervención con aceitunas consumió cerca de 36 mg de sodio, mientras que el segundo grupo de intervención con Arbequinas obtuvo el doble. De acuerdo con las Ingestas Nutricionales de Referencia establecidas por la EFSA (2017), el consumo de sodio debe ser no mayor a 2000 mg para un adulto promedio, con lo cual, al consumir las aceitunas Arbequina se estaría obteniendo menos del 5% de la ingesta recomendada de sodio.

Discusión

En esta primera fase de la intervención nutricional, donde los voluntarios solo consumieron una dosis de 60 o 120 aceitunas y la PA se midió durante 24 horas, se obtuvo una disminución de la PA sistólica de aproximadamente 9 mm Hg desde la primera hora hasta 4 horas después del consumo de 60 aceitunas, y desde las 0,5 horas hasta las 8 horas posteriores a la ingesta de 120 aceitunas, todo esto en comparación con los valores presentados antes del consumo de las Arbequinas. Además, no se encontraron diferencias significativas en la disminución de la PA que exhibieron ambas dosis de Arbequinas. En ausencia de más artículos que evalúen la PA después del consumo de aceitunas, se ha considerado el estudio NUTRAOLEUM con voluntarios sanos (Biel *et al.*, 2016). En este ensayo se ingirieron 30 ml de un aceite de oliva con alto contenido en triterpenos (389 mg/kg) y polifenoles (487 mg/kg) denominado como aceite de oliva funcional (FOO), encontrándose una disminución de la PA sistólica 4 y 6 horas después del consumo del aceite (De la Torre *et al.*, 2020). En los 30 ml de aceite, los voluntarios ingirieron aproximadamente 12 mg de triterpenos y 15 mg de polifenoles (De la Torre *et al.*, 2020), mientras que, en nuestra intervención con 60 aceitunas, los sujetos consumieron aproximadamente 200 mg de triterpenos y 70 mg de polifenoles. Estudios recientes resaltan la importancia de los microcomponentes del aceite de oliva en su acción hipotensora (Covas *et al.*, 2006; Rodríguez-Rodríguez, 2015) y se ha propuesto que esta acción está mediada por la mejora de la función endotelial (Perona *et al.*, 2006; De la Torre *et al.*, 2020). Los triterpenos pentacíclicos son potentes reguladores de factores de transcripción, proteínas quinasas y otras moléculas asociadas al síndrome metabólico (Sharma *et al.*, 2018). De acuerdo con estudios realizados en cultivos celulares, el ácido oleanólico conduce a la activación de la proteína quinasa B (Akt) y de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) que están involucrados en la respuesta del factor nuclear 2 derivado del eritroide (Nrf2) y posterior regulación positiva de la expresión de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1). Así, la mejora de la actividad y expresión de HO-1 puede proteger a las células del musculo liso vascular del estrés oxidativo (Feng *et al.*, 2011). Por otra parte, también se ha descrito que el ácido maslínico actúa a través de la vía Akt/Nrf2/HO-1 protegiendo a las células vasculares del daño oxidativo (Qin *et al.*, 2014). En relación con los polifenoles, el hidroxitirosol regula positivamente la defensa antioxidante de las células endoteliales al aumentar la expresión y la actividad de las catalasas a través de la fosforilación de la quinasa activada por AMP (AMPK) y la activación de la proteína *forkhead box O3a* (FOXO3a) (Zrelli *et al.*, 2011). Por último, se ha descrito que la luteolina protege a las células endoteliales contra la apoptosis inducida por peróxido de hidrogeno inhibiendo la activación de la vía de señalización mediada por las proteínas quinasas p38 activadas por mitógenos (P38 MAPK) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) (Chen *et al.*, 2020). De esta manera, la reducción de la PA después del consumo de las aceitunas podría ser consecuencia del mejoramiento de la función endotelial mediada por el ácido maslínico, ácido

oleanólico, hidroxitirosol y luteolina, los cuales son los principales compuestos triterpénicos y fenólicos de las aceitunas.

En la segunda fase de la intervención nutricional, donde los voluntarios ingirieron 60 aceitunas cada día durante 30 días, no se encontraron diferencias en la PA en comparación con los valores presentados por el grupo control. Cabe mencionar que, en esta fase, el consumo de esta dosis de aceitunas se distribuyó en dos ingestas, 30 en el almuerzo y 30 en la cena y la PA fue evaluada a la mañana siguiente de los días 15 y 30 de la intervención nutricional. Por ello, pasaron más de 4 horas entre la ingestión de las aceitunas y la medición de la PA, tiempo en el que se encontró el efecto hipotensor de las aceitunas en la primera fase de la intervención nutricional. Aunque existe una falta de ensayos clínicos que evalúen el efecto de las aceitunas en la PA, se ha presentado un ensayo clínico que evalúa las propiedades nutraceuticas de este alimento a través de una intervención nutricional con 12 aceitunas Nocellara del Belice por día durante 30 días en sujetos sanos, encontrando disminuciones del malondialdehído, molécula relacionada con el estrés oxidativo y de la interleucina-6 (Accardi *et al.*, 2016). Otros ensayos realizados con aceite de oliva han encontrado que la ingesta de FOO enriquecido con los ácidos maslínico y oleanólico por tres semanas evita la oxidación del ADN y reduce los biomarcadores inflamatorios plasmáticos como la interleucina-8 y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) en voluntarios sanos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). Además, la ingesta de 25 ml de aceite de oliva con alto contenido en polifenoles (366 mg/kg) por tres semanas puede contribuir al control del riesgo cardiovascular ya que disminuye las concentraciones plasmáticas de las LDL y su aterogenicidad en hombres sanos (Hernández *et al.*, 2015).

Tanto los estudios experimentales como los realizados en humanos, son en general firmes al mostrar los efectos antihipertensivos del aceite de oliva. No obstante, sobre la base de los resultados revisados por Massaro *et al.* (2020) es difícil establecer cuál es el componente que contribuye de manera más eficaz a la regulación de la PA. Esta misma situación podría extrapolarse a las aceitunas. Por otra parte, es importante insistir en que si bien, el aumento de los componentes bioactivos como los triterpenos y los compuestos fenólicos en el aceite de oliva es una forma de mejorar la salud de los consumidores (Biel *et al.*, 2016), se debe considerar que las aceitunas por sí mismas contienen una cantidad mucho más elevada de triterpenos y polifenoles que los aceites de oliva enriquecidos, tal es el caso del aceite utilizado por de la Torre *et al.* (2020) en el estudio NUTRAOLEUM.

En la segunda fase de la intervención nutricional, donde los voluntarios ingirieron 60 aceitunas cada día durante 30 días, tampoco se encontraron diferencias en el peso corporal de los sujetos en comparación con los valores presentados por el grupo control. Tal como se ha indicado anteriormente, 100 g de aceitunas Arbequina proporcionan 211 kcal y 21,0 g de lípidos totales. Teniendo en cuenta

Discusión

que los voluntarios asignados al grupo de 60 aceitunas consumieron aproximadamente 66 g de pulpa de aceitunas, el grupo de intervención con aceitunas recibió 139 kcal y 14 g de lípidos totales. Según las Ingestas Nutricionales de Referencia establecidos por la EFSA (2017), el consumo de energía al día debe ser de aproximadamente 2000 kcal y el de lípidos totales de alrededor de 60 g para un adulto promedio. De esta manera, la ingesta de 60 aceitunas aportaría el 7% de la energía y el 23% de los lípidos recomendados por la EFSA (2017). En relación con el contenido de energía, las aceitunas pueden considerarse como un *snack* saludable ya que las recomendaciones dietéticas indican que los *snacks* pueden aportar entre 150 y 300 kcal o representar entre el 5% y el 15% de la ingesta energética diaria (Potter *et al.*, 2018). Respecto al contenido de grasas totales, las aceitunas contienen principalmente ácidos grasos monoinsaturados que contribuyen a una proporción deseable de grasas monoinsaturadas/saturadas (Serra-Majem *et al.*, 2020). Por otra parte, es importante destacar que en la intervención nutricional con 12 aceitunas Nocellara del Belice por día durante 30 días de Accardi *et al.* (2016), la masa grasa de los voluntarios disminuyó significativamente y la masa muscular aumentó, lo anterior puede ser debido a la inhibición de la lipogénesis provocada por el ácido linoleico conjugado, molécula presente en las aceitunas. Además, se ha descrito que el consumo de 50 mg de ácido maslínico al día por 3 meses disminuye el peso corporal en voluntarios (Fukumitsu *et al.*, 2016). En contraparte, los voluntarios que participaron en la segunda fase de la intervención nutricional referida en la presente tesis ingirieron 155 mg de ácido maslínico mediante el consumo de las aceitunas Arbequina, cantidad tres veces mayor que la utilizada en el estudio de Fukumitsu *et al.* (2016).

En respuesta a la creciente demanda de alimentos con alto contenido en fitoquímicos, la industria alimentaria y los grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en desarrollar nuevos alimentos funcionales o en estudiar más a fondo los existentes. Las aceitunas entran claramente en la segunda categoría, estableciéndose como un alimento destacado por su equilibrado perfil nutricional y sus notables concentraciones de compuestos bioactivos. Por ello, la presente tesis representa un hito en la investigación sobre las características farmacocinéticas de los triterpenos pentacíclicos después del consumo de las aceitunas y el efecto de este alimento sobre la presión arterial y el peso corporal. Con base en los hallazgos obtenidos en la presente tesis, se puede concluir que las aceitunas son una buena fuente dietética de compuestos bioactivos que ejercen un efecto positivo en la presión arterial y por lo tanto podrían considerarse como un alimento saludable y como un alimento funcional.

VI. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten establecer las siguientes conclusiones de acuerdo con los objetivos previamente planteados:

1. Estudio de los triterpenos pentacíclicos y los polifenoles en las aceitunas de mesa de la variedad Arbequina y en el pienso comercial para rata.

- 1.1. La concentración total de los triterpenos encontrados en las aceitunas de la variedad Arbequina fue de aproximadamente 3,5 g/kg. El 73% de estos compuestos corresponden al ácido maslínico, seguido del ácido oleanólico con 26% y el eritrodiol con el 1%.
- 1.2. En las aceitunas Arbequina se identificaron 15 polifenoles que sumaron una concentración total de aproximadamente 1 g/kg. El hidroxitirosol representó el 45% de los polifenoles encontrados, seguido del verbascósido con 32% y la luteolina con 9%. Los 12 compuestos restantes representaron el 14% de los polifenoles cuantificados.
- 1.3. Los resultados indican que la ingesta diaria de 9 aceitunas Arbequina proporciona los 5 mg de hidroxitirosol que la EFSA declara ser suficiente para ejercer una actividad cardioprotectora (Reg. EU n° 432/2012). Asimismo, esta porción de aceitunas aporta importantes cantidades de otros polifenoles además de triterpenos pentacíclicos que también pueden proporcionar efectos beneficiosos para la salud.
- 1.4. En el pienso comercial no se detectó la presencia de ningún triterpeno pentacíclico. En relación con los polifenoles, solo se hallaron $0,26 \pm 0,001$ mg/kg de ácido cafeico, $0,54 \pm 0,004$ mg/kg de ácido vanílico y $1,72 \pm 0,004$ mg/kg de ácido *p*-cumárico.

2. Concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en ratas después de la administración oral de aceitunas de la variedad Arbequina.

- 2.1. Se ha administrado por sonda intragástrica un homogenado de aceitunas deshuesadas a ratas Sprague-Dawley a las dosis de 3,85 y 7,70 g/kg equivalentes al consumo en humanos de 30 y 60 aceitunas, respectivamente. Los triterpenos pentacíclicos determinados en plasma fueron los ácidos maslínico y oleanólico, mientras que el eritrodiol no fue detectado.

Conclusiones

- 2.2.** En ambas dosis de aceitunas Arbequina la T_{max} del ácido maslínico se presentó 6 horas después de la administración de las aceitunas con una C_{max} de aproximadamente 50 nM a la dosis de 3,85 g de aceitunas/kg que se duplicó en la dosis de 7,70 g de aceituna/kg.
- 2.3.** La biotransformación del ácido maslínico resultó en la formación de 9 metabolitos de fase I y II. De acuerdo con las áreas bajo la curva (AUC) presentadas por el compuesto padre y sus derivados en ambas dosis de aceitunas, el AUC del ácido maslínico fue de aproximadamente un 60%. El metabolito dihidroxilado y deshidrogenado fue el derivado más abundante alcanzando hasta el 21% de los compuestos. Los metabolitos monohidroxilados comprendieron hasta el 15%, el metabolito monohidroxilado y deshidrogenado con adición de un ácido glucurónico llegó hasta el 3% y los metabolitos monohidroxilados y deshidrogenados comprendieron solamente el 1%.
- 2.4.** El ácido oleanólico presentó su T_{max} a las 6 horas después de la administración de las aceitunas en ambas dosis. La C_{max} de aproximadamente 3,5 nM fue presentada por la ingesta de 3,85 g de aceitunas/kg, mientras que al administrar 7,70 g de aceitunas/kg fue de 11,4 nM.
- 2.5.** El ácido oleanólico fue extensamente biotransformado en 5 metabolitos de fase I y II. Considerando las AUC presentadas por el compuesto padre y sus derivados en ambas dosis de aceitunas, este compuesto fue ampliamente metabolizado ya que los derivados monohidroxilados se encontraron hasta en un 73% y los metabolitos con adición de un grupo sulfato representaron hasta el 10% de los compuestos. Por otra parte, el ácido oleanólico representó aproximadamente el 17% de las AUC.
- 2.6.** La estimación de los parámetros farmacocinéticos de los ácidos maslínico y oleanólico, podría proporcionar una base científica para establecer recomendaciones más eficaces del consumo de las aceitunas de mesa Arbequina, como una fuente dietética de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud.

3. Efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina en la presión arterial y el peso corporal en ratas normotensas e hipertensas.

- 3.1.** La administración oral de una dosis única de 3,85 g de aceitunas/kg tuvo un efecto hipotensor en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) desde la segunda hora hasta 10 horas después del ensayo, alcanzando disminuciones de la presión arterial sistólica y diastólica de aproximadamente 15 mm Hg.

- 3.2. El consumo diario de 3,85 g de aceitunas/kg durante 49 días provocó el decremento de la presión arterial en las ratas hipertensas a partir de los 14 días hasta los 49 días del estudio. Las aceitunas disminuyeron la presión arterial sistólica y diastólica en aproximadamente 15 mm Hg.
- 3.3. La administración de una dosis única y repetida durante 49 días de 3,85 g de aceitunas/kg no modificó la presión arterial en las ratas Wistar Kyoto normotensas (WKY).
- 3.4. El peso corporal, la ingesta de agua, el consumo de alimento y la eficiencia de conversión alimenticia de las ratas normotensas e hipertensas no se modificaron durante los 49 días de la ingesta diaria de aceitunas en comparación con su respectivo grupo control.
- 3.5. En ambas cepas, los pesos relativos del riñón, hígado, corazón, bazo y pulmones, así como los depósitos de grasa de los animales, no fueron afectados por la administración oral diaria de las aceitunas durante 49 días en comparación con su respectivo grupo control.
- 3.6. Las aceitunas aportan ácidos maslínico y oleanólico y pequeñas cantidades de eritrodiol. Al finalizar el estudio y entre 15 a 17 horas después de la última administración de las aceitunas, se hallaron en el plasma de los animales aproximadamente 5 nM de ácido maslínico y sus derivados y alrededor de 1 nM de ácido oleanólico. Por otra parte, de los 15 polifenoles aportados por las aceitunas solo se encontraron concentraciones plasmáticas menores al 1 nM de hidroxitirosol y luteolina.

4. Intervención nutricional: concentraciones plasmáticas y farmacocinética de los triterpenos pentacíclicos y sus metabolitos en voluntarios sanos después del consumo de aceitunas de la variedad Arbequina.

- 4.1. En la intervención nutricional en la que se administra una dosis única de aceitunas Arbequina, los ácidos maslínico y oleanólico fueron hallados en el plasma de los voluntarios sanos desde las 0,5 hasta 24 horas después de la ingestión de las aceitunas, mientras que el eritrodiol no fue detectado en plasma durante el período estudiado, tanto en la administración de 60 como de 120 aceitunas.
- 4.2. La T_{max} del ácido maslínico se halló a las 3,6 horas después del consumo de 60 aceitunas, mientras que la alcanzada después de la ingestión de 120 aceitunas fue a las 5 horas. Al ingerir 120 aceitunas, la C_{max} fue de aproximadamente 390 nM frente a 150 nM al consumir 60 aceitunas.
- 4.3. El ácido maslínico fue metabolizado generando 3 metabolitos de fase I. De acuerdo con las AUC presentadas por el compuesto padre y sus derivados en ambas dosis de aceitunas, el ácido

Conclusiones

maslínico fue el compuesto más abundante, representando aproximadamente el 85% de los compuestos, seguido por el metabolito monohidroxilado (10%). El metabolito monohidroxilado y deshidrogenado y el derivado dihidroxilado y deshidrogenado representaron el 4% y 2% de los compuestos.

- 4.4. El ácido oleanólico presentó su T_{max} a las 2,6 y 4,4 horas después del consumo de 60 y 120 aceitunas, respectivamente. Por otra parte, la C_{max} de aproximadamente 8 nM generada por el consumo de 60 aceitunas, fue duplicada debido a la ingesta de 120 aceitunas. En este ensayo, no se encontraron metabolitos del ácido oleanólico en el plasma de los voluntarios.
- 4.5. En la intervención nutricional en la que se ingería diariamente 60 aceitunas (30 en el almuerzo y 30 en la cena) durante 30 días, se encontraron concentraciones plasmáticas de ácido maslínico de aproximadamente 300 nM a las 12 horas después de la última ingesta. Estos valores duplicaron a la C_{max} de este compuesto hallada en el estudio farmacocinético con 60 aceitunas en voluntarios sanos.
- 4.6. Después de 30 días del consumo diario de 60 aceitunas, y 12 horas después de la última ingestión de las 30 aceitunas de la cena, las concentraciones de ácido oleanólico halladas en el plasma de los voluntarios fueron de aproximadamente 11 nM, valores similares a los presentados en la C_{max} de este triterpeno en el estudio farmacocinético con 60 aceitunas en humanos.

5. Intervención nutricional: efecto de la ingesta de aceitunas de la variedad Arbequina sobre la presión arterial y el peso corporal en voluntarios sanos.

- 5.1. La ingesta única de las aceitunas por los voluntarios disminuyó la presión arterial sistólica en aproximadamente 9 mm Hg desde la primera hora hasta las 4 horas después del consumo de 60 aceitunas, y desde las 0,5 horas hasta las 8 horas posteriores a la ingesta de 120 aceitunas en comparación con los valores presentados antes del consumo de las Arbequinas. Por otra parte, la presión arterial diastólica permaneció constante durante el estudio.
- 5.2. En la intervención nutricional con 60 aceitunas durante 30 días, la presión arterial sistólica y diastólica de los voluntarios no presentó cambios respecto a los valores observados en el grupo control.
- 5.3. El peso corporal y el índice de masa corporal de los voluntarios sanos que consumieron las 60 aceitunas no se modificó durante los 30 días de la intervención nutricional con aceitunas en comparación con el grupo control.

VII.BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Abdel-Shafy, H.; Mansour, M. Polyphenols: properties, occurrence, content in food and potential effects. In: Gurjar, R.B.; editor. *Environmental Science and Engineering*. Studium Press; 2017, p. 232–261.

Accardi, G.; Aiello, A.; Gargano, V.; Gambino, C.M.; Caracappa, S.; Marineo, S.; *et al.* Nutraceutical effects of table green olives: a pilot study with *Nocellara del Belice* olives. *Immun. Ageing*. 2016, 5, 13:11. <http://doi:10.1186/s12979-016-0067-y>.

Alexandraki, V.; Georgalaki, M.; Papadimitriou, K.; Anastasiou, R.; Zoumpopoulou, G.; Chatzipavlidis, I.; *et al.* Determination of triterpenic acids in natural and alkaline-treated Greek table olives throughout the fermentation process. *LWT-Food. Sci. Technol.* 2014, 58(2), 609-613. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.005>.

Ali, F.; Rahul; Naz, F.; Jyoti, S.; Siddique, Y.H. Health functionality of apigenin: a review. *Int. J. Food. Prop.* 2017, 20(6), 1197–1238. <http://doi.org/10.1080/10942912.2016.1207188>.

Alipieva, K.; Korkina, L.; Orhan, I.E.; Georgiev, M.I. Verbascoside - a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol. Adv.* 2014, 32(6), 1065-1076. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001>.

Anand David, A.V.; Arulmoli, R.; Parasuraman, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn. Rev.* 2016, 10(20), 84–89. <http://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>.

Bahloul, N.; Kechaou, N.; Mihoubi, N.B. Comparative investigation of minerals, chlorophylls contents, fatty acid composition and thermal profiles of olive leaves (*Olea europaeae* L.) as by-product. *Grasas y Aceites*. 2014, 65(3), 1-9. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0102141>.

Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA). Consultado en <https://www.bedca.net/> [accessed 03 septiembre 2021].

Barranco, D.; Rallo, L. Olive cultivars in Spain. *HortTechnology*. 2000, 10(1), 107-110. <http://10.21273/horttech.10.1.107>.

Bibliografía

Besnard, G.; Terral, J.F.; Cornille, A. On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Ann. Bot.* 2018, *121*(3), 385-403. <http://doi:10.1093/aob/mcx145>.

Bianchi, G.; Murelli, C.; Vlahov, G. Surface waxes from olive fruit. *Phytochemistry*. 1992, *31*(10), 3503-3506. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83716-C](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83716-C).

Bianchi, G. Lipids and phenols in table olives. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2003, *105*(5), 229–242. <http://doi:10.1002/ejlt.200390046>.

Biel, S.; Mesa, M.D.; De la Torre, R.; Espejo, J.A.; Fernández-Navarro, J.R.; Fitó, M.; *et al.* The NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 2016, *16*(1), 404. <https://doi:10.1186/s12906-016-1376-6>.

Boskou, D.; Camposeo, S.; Clodoveo, M.L. Table olives as sources of bioactive compounds. In: Boskou, D.; editor. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. AOCS PRESS; 2015, p. 217-259. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50014-8>

Boskou, D. Table olives: a vehicle for the delivery of bioactive compounds. *J. Exp. Food. Chem.* 2017, *3*(1), 123-129. <https://doi:10.4172/2472-0542.1000123>.

Brenes, M.; Kailis, S.G. Naturally processed table olives, their preservation and uses. In: Ball, M.R.; editor. *Olives and olive oil in health and disease prevention*. Academic Press; 2021, p. 15-25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819528-4.00054-7>.

Breton, C.M.; Warnock, P.; Bervillé, A.J. Origin and history of the olive. In: Muzzalupo, I.; editor. *Olive Germplasm*. InTechOpen; 2012, p. 4-21. <https://doi.org/10.5772/51933>.

Buckland, G.; Pastor, A.; Lujan-Barroso, L.; Gonzalez, C.A.; Travier, N.; Amiano, P.; *et al.* Determination of oleanolic acid in human plasma and its association with olive oil intake in healthy Spanish adults within the EPIC Spain cohort study. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2017, *61*(8). <https://doi:10.1002/mnfr.201600927>.

Buñag, R.D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J. Appl. Physiol.* 1973, *34*(2), 279-282. <https://doi:10.1152/jappl.1973.34.2.279>.

Caballero, J.M.; Del Río, C. The olive world germplasm bank of Spain. *Acta Horticulturae*. 2008, *791*(1), 31–38. <https://doi:10.17660/actahortic.2008.791.1>.

- Campus, M.; Değirmencioğlu, N.; Comunian, R. Technologies and trends to improve table olive quality and safety. *Front. Microbiol.* 2018, 9(617). <https://doi:10.3389/fmicb.2018.00617>.
- Cárdenas, P.D.; Almeida, A.; Bak, S. Evolution of structural diversity of triterpenoids. *Front. Plant. Sci.* 2019, 10(1523). <https://doi:10.3389/fpls.2019.01523>.
- Charoenprasert, S.; Mitchell, A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J. Agric. Food. Chem.* 2012, 60(29), 7081-7095. <https://doi:10.1021/jf3017699>.
- Chen, H.I.; Hu, W.S.; Hung, M.Y.; Ou, H.C.; Huang, S.H.; Hsu, P.T.; et al. Protective effects of luteolin against oxidative stress and mitochondrial dysfunction in endothelial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2020, 30(6):1032-1043. <https://doi:10.1016/j.numecd.2020.02.014>.
- Chen, G.; Li, J.; Song, C.; Suo, Y.; You, J. A sensitive and efficient method for simultaneous trace detection and identification of triterpene acids and its application to pharmacokinetic study. *Talanta*, 2012, 98, 101-111. <http://doi:10.1016/j.talanta.2012.06.053>.
- Chen, S.; Yang, B.; Xu, Y.; Rong, Y.; Qiu, Y. Protection of luteolin-7-O-glucoside against apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation through the MAPK pathways in H9c2 cells. *Mol. Med. Rep.* 2018, 17(5), 7156-7162. <http://doi.org/10.3892/mmr.2018.8774>.
- Christian, M.S.; Sharper, V.A.; Hoberman, A.M.; Seng, J.E.; Fu, L.; Covell, D.; et al. The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug. Chem. Toxicol.* 2004, 27(4), 309-330. <https://doi.org/10.1081/dct-200039714>.
- Colomba, G. El olivar en el Mediterráneo. Evolución del cultivo en Italia y España a partir del siglo XVIII. *RSA Journal.* 2017, 2, 39-58.
- Corzo-Martínez, M.; Corzo, N.; Villamiel, M.; Del Castillo M.D. Browning reactions. In: Simpson, B.K.; Nollet, L.M.L.; Toldrá, F.; Benjakul, S.; Paliyath, G.; Hui, Y.H.; editors. *Food biochemistry and food processing*. John Wiley and Sons; 2012, p. 56-83.
- Covas, M.I.; Ruiz-Gutiérrez, V.; De la Torre, R.; Kafatos, A.; Lamuela-Raventós, R.M.; Osada, J.; et al. Minor Components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews.* 2006, 64(s4), s20-s30. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2006.tb00260.x>

Bibliografía

D'Antuono, I.; Bruno, A.; Linsalata, V.; Minervini, F.; Garbetta, A.; Tufariello, M.; *et al.* Fermented Apulian table olives: Effect of selected microbial starters on polyphenols composition, antioxidant activities and bioaccessibility. *Food Chem.* 2018, 248, 137-145. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.032>.

De la Torre, R.; Carbó, M.; Pujadas, M.; Biel, S.; Mesa, M.D.; Covas, M.I.; *et al.* Pharmacokinetics of maslinic and oleanolic acids from olive oil - Effects on endothelial function in healthy adults. A randomized, controlled, dose-response study. *Food Chem.* 2020, 322, 126676. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126676>.

Delgado, A.M.; Issaoui, M.; Chammem, N. Analysis of main and healthy phenolic compounds in foods. *JAOAC Int.* 2019, 102(5), 1356-1364. <http://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0128>.

Diarte, C.; Po-Han, L.; Huang, H.; Romero, A.; Casero, T.; Gatiús, F.; *et al.* Insights into olive fruit surface functions: a comparison of cuticular composition, water permeability, and surface topography in nine cultivars during maturation. *Front. Plant Sci.* 2019, 10(1484). <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.01484>.

Diez, C.M.; Trujillo, I.; Martínez-Urdiroz, N.; Barranco, D.; Rallo, L.; Marfil, P.; Gaut, B.S. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytol.* 2015, 206(1), 436-447. <http://doi.org/10.1111/nph.13181>.

Di Giancamillo, A.; Rossi, R.; Pastorelli, G.; Deponti, D.; Carollo, V.; Casamassima, D.; Domeneghini, C.; Corino, C. The effects of dietary verbascoside on blood and liver oxidative stress status induced by a high n-6 polyunsaturated fatty acids diet in piglets. *J. Anim. Sci.* 2015, 93(6), 2849–2859. <http://doi.org/10.2527/jas.2014-8607>.

Dornas W.C.; Silva, M.E. Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* 2011, 36(4), 731-737. <http://doi.org/10.1007/s12038-011-9097-y>.

Durante, M.; Tufariello, M.; Tommasi, L.; Lenucci, M.S.; Bleve, G.; Mita, G. Evaluation of bioactive compounds in black table olives fermented with selected microbial starters. *J. Sci. Food Agric.* 2018, 98(1), 96-103. <http://doi.org/10.1002/jsfa.8443>.

Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E.B.; Cicala, C.; Caiazzo, E.; Izzo, A.A.; Novellino, E.; Santini, S. Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phyther. Res.* 2019, 33(9), 2221–2243. <http://doi.org/10.1002/ptr.6419>.

Ettehad, D.; Emdin, C.A.; Kiran, A.; Anderson, S.G.; Callender, T.; Emberson, J.; *et al.* Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2016, 387(10022), 957-967. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01225-8).

European Commission. The Database of Origin & Registration. eAmbrosia. The EU geographical indications register (DOOR). <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/#> [accessed 05 febrero 2020].

European Commission. Eurostat. Statistics explained. 2018. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_orchards#Olive_trees [accessed 05 febrero 2020].

European Commission. Directorate General for Agriculture and Rural Development. Minutes of the meeting of the “Working Group on Olives” of the civil dialogue group on “Horticulture, Olives and Spirits”. Ref. Ares(2019). Brussels, https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/civil-dialogue-groups/horticulture-olives-spirits/2019-06-07/minutes_pm.pdf. [accessed 05 febrero 2020].

European Commission. The Database of Origin & Registration. eAmbrosia. The EU geographical indications register (DOOR). <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/#> [accessed 05 febrero 2020].

European Food Safety Authority (EFSA). Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children’s development and health. *Off. J. Eur. Union*. 2012, 136, 1.

European Food Safety Authority (EFSA). Dietary reference values. 2017. Consultado en <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/dietary-reference-values> [accessed 01 septiembre 2021].

European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on Bioanalytical Method Validation. London; 2011.

Feng, J.; Zhang, P.; Chen, X.; He, G. PI3K and ERK/Nrf2 pathways are involved in oleanolic acid-induced heme oxygenase-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biochem*. 2011, 112(6), 1524-1531. <https://doi:10.1002/jcb.23065>.

Food and Agriculture Organization (FAO) 2017. The statistical database (FAOSTAT). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. [accessed 23 abril 2020].

Bibliografía

Food and Agriculture Organization - World Health Organization (FAO-WHO). Codex Alimentarius. International Food Standards. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on processed fruits and vegetables. 22nd Session, Washington, DC. 2004. http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCPFV/ccpfv22/pf22_10e.pdf [accessed 05 febrero 2020].

Frank, J.; Fukagawa, N.K.; Bilia, A.R.; Johnson, E.J.; Kwon, O.; Prakash, V.; *et al.* Terms and nomenclature used for plant-derived components in nutrition and related research: efforts toward harmonization. *Nutr. Rev.* 2020, 78(6), 1-8. <http://doi.org/10.1093/nutrit/nuz081>.

Fukumitsu, S.; Villareal, M.O.; Kazuhiko, A.; Hino, H.; Hori, N.; Isoda, H.; Naito, Y. Maslinic acid in olive fruit alleviates mild knee joint pain and improves quality of life by promoting weight loss in the elderly. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2016, 59(3): 220–225. <http://doi:10.3164/jcfn.16-40>.

Galili, E.; Langgut, D.; Terral, J.F.; Barazani, O.; Dag, A.; Kolska Horwitz, L.; *et al.* Early production of table olives at a mid-7th millennium BP submerged site off the Carmel coast (Israel). *Scientific Reports.* 2021, 11(2218). <http://doi.org/10.1038/s41598-020-80772-6>.

Generalitat de Catalunya. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. Dossiertécnic 80. 2015. Formació i Assessorament al Sector Agroalimentari. L'oli d'oliva a Catalunya. <https://ruralcat.gencat.cat/documents/20181/160840/DT80.+L%27oli+d%27oliva/606b0378-2b45-4b78-9971-adf84fa5bbe4> [accessed 05 febrero 2020].

Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K.M.; Anwarul-Hassan, G.; Saari, G. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) - A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13(3), 3291–3340. <http://doi:10.3390/ijms13033291>.

Giménez, E.; Juan M.E.; Calvo-Melià, S.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V.; Planas, J.M. Pentacyclic triterpene in *Olea europaea* L: A simultaneous determination by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2015, 1410, 68-75. <http://doi:10.1016/j.chroma.2015.07.064>.

Giménez, E.; Juan, M.E.; Calvo-Melià, S.; Planas, J.M. A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination in plasma of pentacyclic triterpenes of *Olea europaea* L. *Food Chem.* 2017, 229, 534-541. <http://doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.116>.

Gómez-González, S.; Ruiz-Jiménez, J.; Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M.D. Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching. *J. Agric. Food. Chem.* 2010, 58(23), 12292-12299. <http://doi:10.1021/jf102350s>.

Guerrero, M.N.; López, M.J.; Caudullo, M.; De Rigo G. *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J.; De Rigo, D.; Caudullo, G.; Houston D.T.; Mauri, A. *European Atlas of Forest Tree Species*. Publication Office of the European Union. 2016.

Guinda, A.; Rada, M.; Delgado, T.; Gutiérrez-Adánez, P.; Castellano, J.M. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J. Agric. Food. Chem.* 2010, 58(17), 9685-9691. <http://doi:10.1021/jf102039t>.

Gullón, B.; Lú-Chau, T.A.; Moreira, M.T.; Lema, J.M.; Eibes, G. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends. Food. Sci. Technol.* 2017, 67, 220-235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.008>.

Guo, Z.; Jia, X.; Zheng, Z.; Lu, X.; Zheng, Y.; Zheng, B.; Xiao, J. Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochem. Rev.* 2018, 17, 1091-1110. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9526-0>.

Hernández, A.; Remaley, A.T.; Farràs, M.; Fernández-Castillejo, S.; Subirana, I.; Schröder, H.; *et al.* Olive oil polyphenols decrease LDL concentrations and LDL atherogenicity in men in a randomized controlled trial. *J. Nutr.* 2015, 145(8), 1692-1697. <http://doi:10.3945/jn.115.211557>.

Holčapek, M.; Kolářová, L.; Nobilis, M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391(1): 59–78. <http://doi:10.1007/s00216-008-1962-7>.

Hostetler, G.L.; Ralston, R.A.; Schwartz, S.J. Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Bioactivity. Adv. Nutr.* 2017, 8(3), 423–435. <http://doi.org/10.3945/an.116.012948>.

Infante-Amate, J. The ecology and history of the Mediterranean olive grove: the Spanish great expansion, 1750–2000. *Rural History.* 2012, 23(2), 161–184. <http://doi:10.1017/S0956793312000052>.

Bibliografía

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA). 2018. <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/web/noticias/se-buscan-variedades-locales-de-olivo-no-identificadas-para-la-coleccion-mundial-de> [accessed 05 febrero 2020].

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guideline for good clinical practice E6(R1). Geneva: ICH Harmonised Tripartite Guideline; 1996.

International olive council (IOC). Oficial Journal of the international olive council. 126 edition. 2019. *Olivae*. <https://www.internationaloliveoil.org/product/olivae-126-english-edition/> [accessed 05 febrero 2020].

Jeong, D.W.; Kim, Y.H.; Kim, H.H.; Ji, H.Y.; Yoo, S.D.; Choi, W.R.; *et al.* Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm. Drug. Dispos.* 2007, 28(2), 51-57. <http://doi:10.1002/bdd.530>.

Jimenez-Lopez, C.; Carpena, M.; Lourenço-Lopes, C.; Gallardo-Gomez, M.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods*. 2020. 9(8), Article 1014. <http://doi.org/10.3390/foods9081014>.

Johnson, P.R.; Hirsch, J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J. Lipid. Res.* 1972, 13(1):2-11.

Juan, M.E.; Moreno-González, R.; Planas, J.M. Pentacyclic triterpenes in table olives: determination of their composition and bioavailability by LC-MS. *Open Access J. Pharm. Res.* 2020, 000eB-001.

Kailis, S.G.; Kiritsakis, A. Table olives: processing, nutritional and health implications. In: Shahidi, F.; Kiritsakis, A.; editors. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*. John Wiley & Sons Ltd; 2017, p. 295-324. <http://doi:10.1002/9781119135340>.

Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Ioannou, M.; Karathanos, V.T.; Hassapidou, M.; Andrikopoulou, N.K. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chem.* 2010, 121(3), 682-690. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.005>.

Kaniewski, D.; Van Campo, E.; Boiy, T.; Terral, J.F.; Khadari, B.; Besnard, G. Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2012, 87(4), 885-899. <http://doi:10.1111/j.1469-185X.2012.00229.x>.

Karković Marković, A.; Torić, J.; Barbarić, M.; Jakobušić Brala, C. Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules.* 2019, 24(10), 2001. <http://doi.org/10.3390/molecules24102001>.

Khan, M.N.; Soherwardy, R.; Sarwar, A. Nutritional assessment of olive fruit (*Olea europaea*) available at local market. *IFRJ.* 2015, 22(2), 526-531.

Kim, E.; Noh, K.; Lee, S.J.; Shin, B.; Hwang, J.T.; Lee, S.W.; Rho, M.C.; Kang, W. Simultaneous determination of 3-O-acetyloleanolic acid and oleanolic acid in rat plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 118, 96-100. <http://doi:10.1016/j.jpba.2015.10.030>.

Kim, S.J.; Kim, M.C.; Um, J.Y.; Hong, S.H. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules.* 2010, 15(10), 7208–7217. <http://doi.org/10.3390/molecules15107208>.

Kiritsakis, A.; Shahidi, F.; Anousakis, C. Antioxidants of olive oil, olive leaves, and their bioactivity. In: Shahidi, F.; Kiritsakis, A.; editors. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*. John Wiley & Sons Ltd; 2017, p. 368-382. <http://doi:10.1002/9781119135340>.

Kiritsakis, K.; Kiritsakis, A.; Manousaki-Karacosta, E.; Genigeorgis, F. Table olives and olive oil: production, processing, composition, and nutritional qualities. In: Nirmal K. Sinha, editor. *Handbook of vegetables and vegetable processing*. Wiley Blackwell; 2010, p. 663-681. <https://doi.org/10.1002/9780470958346.ch33>.

Kostelenos, G.; Kiritsakis, A. Olive tree history and evolution. In: Shahidi, F.; Kiritsakis, A.; editors. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*. John Wiley & Sons Ltd; 2017, p. 368-382. <http://doi:10.1002/9781119135340>.

Kountouri, A.M.; Mylona, A.; Kaliora, A.C.; Andrikopoulos, N.K. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine.* 2007, 14, 659–667, <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.06.001>.

Bibliografía

Kundisová, I.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Simultaneous determination of phenolic compounds in plasma by LC-ESI-MS/MS and their bioavailability after the ingestion of table olives. *J. Agric. Food. Chem.* 2020, 68, 10213-10222. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04036>.

Lanza, B. Nutritional and sensory quality of table olives. In: Muzzalupo, I.; editor. *Olive Germplasm*. InTechOpen; 2012, p. 343-372. <https://doi.org/10.5772/51723>.

Lerman, L.O.; Kurtz, T.W.; Touyz, R.M.; Ellison, D.H.; Chade, A.R.; Crowley, S.D.; *et al.* Animal models of hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*. 2019, 73(6), e87-e120. <http://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090>.

Li, G.L.; You, J.M.; Song, C.H.; Xia, L.; Zheng, J.; You-Rui S. Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 2011, 59(7): 2972-2979. <https://doi.org/10.1021/jf104224t>.

Li, N.; Liu, C.; Mi, S.; Wang, N.; Zheng, X.; Li, Y.; Huang, X.; He, S.; Chen, H.; Xu, X. Simultaneous determination of oleanolic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, kaemperol and quercetin in rat plasma by LC-MS-MS and application to a pharmacokinetic study of *Oldenlandia diffusa* extract in rats. *J. Chromatogr. Sci.* 2012, 50(10), 885-892. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms086>.

Li, T.X.; Chu, C.S.; Zhu, J.W.; Yang, T.Y.; Zhang, J.; Hu, Y.T.; Yang, X.H. A rapid UPLC-MS/MS method for the determination of oleanolic acid in rat plasma and liver tissue: application to plasma and liver pharmacokinetics. *Biomed Chromatogr.* 2016, 30(4), 520-527. <https://doi.org/10.1002/bmc.3577>.

Li, Y.; Guo, S.; Hua, T.; Wang, Y.; Wei, D.; Zhao, M.; Su, S.; Duan J.A. Comparative pharmacokinetics of triterpenic acids in normal and immunosuppressed rats after oral administration of *Jujubae Fructus* extract by UPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2018, 1077-1078, 13-21. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.026>.

Li, Z.H.; Zhu, H.; Cai, H.P.; He, D.D.; Hua, J.L.; Ju, J.M.; *et al.* Simultaneous determination of five triterpene acids in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in pharmacokinetic study after oral administration of Folium Eriobotryae effective fraction. *Biomed Chromatogr.* 2015, 29(12), 1791-1797. <https://doi.org/10.1002/bmc.3497>.

López-Lázaro, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2009, 9(1), 31-59. <http://doi.org/10.2174/138955709787001712>.

Lozano-Mena, G.; Sánchez-González, M.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives - a promising nutraceutical? *Molecules*. 2014, 19(8), 11538-11559. <http://doi:10.3390/molecules190811538>.

Ludwiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M.I. Terpenoids. *Pharmacognosy*. 2017, 233–266. <http://doi:10.1016/b978-0-12-802104-0.00011-1>.

Magnani, C.; Isaac, V.L.B.; Correa, M.A.; Salgado, H.R.N. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Anal. Methods*. 2014, 6(10), 3203. <http://doi.org/10.1039/c3ay41807c>.

Malheiro, R.; Mendes, P.; Fernandes, F.; Rodrigues, N.; Bento, A.; Pereira, J.A. Bioactivity and phenolic composition from natural fermented table olives. *Food Funct*. 2014, 5(12), 3132-3142. <http://doi:10.1039/c4fo00560k>.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79(5), 727-747. <http://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.

Maris, M.E.; Melchert, R.B.; Joseph, J.; Kennedy, R.H. Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005, 32(1-2), 35-39. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04156.x>.

Martínez, J.R.; Villarino, A.; Serrano, L.; Lezcano, C.; Urrialde, R.; Sánchez, F.J.; Castro, M.J.; Cao, M.J. Aceite de oliva y la dieta mediterránea. In: Consejería de Sanidad. D. G. de Salud Pública, editor. *Colección Nutrición y Salud*. 2006.

Massaro, M.; Scoditti, E.; Carluccio, M.A.; Calabriso, N.; Santarpino, G.; Verri, T.; De Caterina, R. Effects of olive oil on blood pressure: epidemiological, clinical, and mechanistic evidence. *Nutrients*. 2020, 12(6), 1548. <http://doi:10.3390/nu12061548>.

Mataix V. J.; Barbancho, F.G.C. El aceite de oliva en la alimentación mediterránea. I Congreso de la Cultura del Olivo, 2007, 707-764. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2523870> 23/01/2020 [accessed 05 febrero 2020].

Medina, E.; Morales-Sillero, A.; Ramírez, E.M.; Rallo, P.; Brenes, M.; Romero, C. New genotypes of table olives: profile of bioactive compounds. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 2012, 47(11), 2334-2341. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03107.x>.

Bibliografía

Medina, E.; Romero, C.; García, P.; Brenes, M. Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food Funct.* 2019, 10(8), 4716-4724. <http://doi:10.1039/c9fo00698b>.

Moreno-González, R.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Table olive polyphenols: a simultaneous determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2020a, 1609, 460434. <http://doi:10.1016/j.chroma.2019.460434>.

Moreno-González, R.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Profiling of pentacyclic triterpenes and polyphenols by LC-MS in Arbequina and Empeltre table olives. *LWT-Food. Sci. Technol.* 2020b, 126. <http://doi:10.1016/j.lwt.2020.109310>.

Navaneethan, D.; Rasool, M.K. An experimental study to investigate the impact of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol, on cadmium chloride-induced renal toxicity. *Food Funct.* 2014, 5(10), 2438–2445. <http://doi.org/10.1039/c4fo00346b>.

Nediani, C.; Ruzzolini, J.; Romani, A.; Calorini, L. Oleuropein, a bioactive compound from *Olea europaea* L., as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases. *Antioxidants (Basel).* 2019, 8(12), 578. <http://doi:10.3390/antiox8120578>.

Ninot, A.; Howad, W.; Romero, A. Les varietats catalanes d'olivera. *Quaderns Agraris.* 2019, 46, 7-36. <http://doi:10.2436/20.1503.01.95>.

Okamoto, K.; Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 1963, 27, 282-293. <http://doi:10.1253/jcj.27.282>.

Paiva-Martins, K.; Kiritsakis, A. Olive fruit and olive oil composition and their functional compounds. In: Shahidi, F.; Kiritsakis, A.; editors. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing.* John Wiley & Sons Ltd; 2017, p. 81-115. <http://doi:10.1002/9781119135340>.

Pedret, A.; Fernández-Castillejo, S.; Valls, R.M.; Catalán, U.; Rubió, L.; Romeu, M.; *et al.* Cardiovascular benefits of phenol-enriched virgin olive oils: new insights from the virgin olive oil and HDL functionality (VOHF) study. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2018, 62(16), e1800456. <http://doi:10.1002/mnfr.201800456>.

Pereira, D.M.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules.* 2009, 14(6), 2202–2211. <http://doi:10.3390/molecules14062202>.

Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2010, 64(3), S112-S120. <http://doi:10.1038/ejcn.2010.221>.

Perona, J.S.; Cabello-Moruno, R.; Ruiz-Gutierrez, V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J. Nutr. Biochem.* 2006, 17(7), 429-445. <http://doi:10.1016/j.jnutbio.2005.11.007>.

Picornell, B.M.R.; Melero, M.J.M: Historia del cultivo del olivo y del aceite; su expresión en la Biblia. *Revista de la Facultad de Educación de Albacete.* 2013, 28, 155-181. <http://www.revista.uclm.es/index.php/ensayos> [accessed 01 febrero 2020].

Potter, M.; Vlassopoulos, A.; Lehmann, U. Snacking recommendations worldwide: a scoping review. *Adv Nutr.* 2018, 9(2):86-98. <http://doi:10.1093/advances/nmx003>.

Poudyal, H.; Campbell, F.; Brown, L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J. Nutr.* 2010, 140(5), 946-953. <http://doi.org/10.3945/jn.109.117812>.

Pozo, O.J.; Pujadas, M.; Gleeson, S.B.; Mesa-García, M.D.; Pastor, A.; Kotronoulas, A.; *et al.* Liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of triterpenes in human fluids: Evaluation of markers of dietary intake of olive oil and metabolic disposition of oleanolic acid and maslinic acid in humans. *Anal. Chim. Acta.* 2017, 990, 84-95. <http://doi:10.1016/j.aca.2017.07.041>.

Qin, X.; Qiu, C.; Zhao, L. Maslinic acid protects vascular smooth muscle cells from oxidative stress through Akt/Nrf2/HO-1 pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 2014, 390(1-2), 61-67. <http://doi:10.1007/s11010-013-1956-4>.

Raina, B. L. Olives. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition.* 2003, 4260–4267. <http://doi:10.1016/b0-12-227055-x/00861-0>.

Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008, 22(3), 659–661. <http://doi.org/10.1096/fj.07-9574lsf>.

Rejano, L.; Montaña, A.; Casado, F.J.; Sánchez, A.H.; De Castro A. Table olives: varieties and variations. In: Ball, M.R.; editor. *Olives and olive oil in health and disease prevention.* Academic Press; 2010, p. 5-15. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00001-2>.

Bibliografía

- Rocha, J.; Borges, N.; Pinho, O. Table olives and health: a review. *J. Nutr. Sci.* 2020, 9, e57. <http://doi:10.1017/jns.2020.50>.
- Rodríguez-Pérez, C.; Quirantes-Piné, R.; Lozano-Sánchez, J.; Menéndez, J.; Segura-Carretero, A. Composition and analysis of functional components of olive leaves. In: Shahidi, F.; Kiritsakis, A.; editors. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*. John Wiley & Sons Ltd; 2017, p. 368-382. <http://doi:10.1002/9781119135340>.
- Rodríguez-Rodríguez, R. Oleanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* 2015, 22(11), 1414-1425. <http://doi:10.2174/0929867322666141212122921>.
- Romero, C.; Brenes, M.; Yousfi, K.; García, P.; García, A.; Garrido, A. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agric. Food. Chem.* 2004, 52(3), 479-484. <http://doi:10.1021/jf030525l>.
- Romero, C.; García, A.; Medina, E.; Ruíz-Méndez, M.V.; De Castro, A.; Brenes, M. Triterpenic acids in table olives. *Food Chem.* 2010, 118(3), 670-674. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.037>.
- Romero, C.; Medina, E.; Mateo, M.A.; Brenes, M. Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. *J. Sci. Food. Agric.* 2017, 97(6), 1725-1732. <http://doi:10.1002/jsfa.7920>.
- Romero, C.; García, P.; Medina, E.; Brenes, M. The PDO and PGI table olives of Spain. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2018, 121(3), 1-5. <http://doi-org.sire.ub.edu/10.1002/ejlt.201800136>.
- Romero, C.; Medina, E.; Mateo, M.A.; Brenes, M. New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *J. Sci. Food. Agric.* 2018, 98(1), 225-230. <http://doi:10.1002/jsfa.8460>.
- Romero, M.; Toral, M.; Gómez-Guzmán, M.; Jiménez, R.; Galindo, P.; Sánchez, M.; Olivares, M.; Gálvez, J.; Duarte, J. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food & Function.* 2016, 7(1), 584-593. <http://doi.org/10.1039/c5fo01101a>.
- Rosillo, M.A.; Sánchez-Hidalgo, M.; González-Benjumea, A.; Fernández-Bolaños J.G.; Lubberts, E.; Alarcón-de-la-Lastra, C. Preventive effects of dietary hydroxytyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol in murine collagen-induced arthritis. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59(12), 2537-2546. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201500304>.

Sánchez-González, M.; Colom, H.; Lozano-Mena, G.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2014, 58(10), 1970-1979. <http://doi:10.1002/mnfr.201400147>.

Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Parra, A.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Identification in rat plasma and urine by Linear Trap Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry of the metabolites of maslinic acid, a triterpene from olives. *J. Agric. Food. Chem.* 2015, 63(4), 1126-1132. <http://doi:10.1021/jf505379g>.

Sánchez-Quesada, C.; López-Biedma, A.; Warleta, F.; Campos, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J. Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *J. Agric. Food. Chem.* 2013, 61(50), 12173-12182. <http://doi:10.1021/jf403154e>.

Sanchez-Rodriguez, E.; Biel-Glesson, S.; Fernandez-Navarro, J.R.; Calleja, M.A.; Espejo-Calvo, J.A.; Gil-Extremera, B.; et al. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on biomarkers of oxidative stress and inflammation in healthy adults: a randomized double-blind controlled trial. *Nutrients.* 2019, 11(3): 561. <http://doi:10.3390/nu11030561>.

Sanz-Cortés, F.; Martínez-Calvo, J.; Badenes, M.L.; Bleiholder, H.; Hack, H.; Llácer, G.; Meier, U. Phenological growth stages of olives trees (*Olea europaea*). *Ann. Appl. Biol.* 2002, 140, 151-157.

Sarapis, K.; Thomas, C.J.; Hoskin, J.; George, E.S.; Marx, W.; Mayr, H.L.; et al. The effect of high polyphenol extra virgin olive oil on blood pressure and arterial stiffness in healthy Australian adults: a randomized, controlled, cross-over study. *Nutrients.* 2020, 12(8), 2272. <http://doi:10.3390/nu12082272>.

Sebastiani, L.; Busconi, M. Recent developments in olive (*Olea europaea* L.) genetics and genomics: applications in taxonomy, varietal identification, traceability and breeding. *Plant. Cell. Rep.* 2017, 36(9), 1345-1360. <http://doi:10.1007/s00299-017-2145-9>.

Sedef, N El.; Karakaya, S. Olive tree (*Olea Europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev.* 2009, 67(11), 632-638. <http://doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>.

Serra-Majem, L., Tomaino, L., Dernini, S., Berry, E. M., Lairon, D., Ngo de la Cruz, J., et al. Updating the Mediterranean diet pyramid towards sustainability: focus on environmental concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020, 17(23), <http://doi.org/10.3390/ijerph17238758>.

Bibliografía

Sharma, H.; Kumar, P.; Deshmukh, R.R.; Bishayee, A.; Kumar, S. Pentacyclic triterpenes: new tools to fight metabolic syndrome. *Phytomedicine*, 2018, 50, 166-177. <http://doi:10.1016/j.phymed.2018.09.011>.

Song M, Hang, T.J.; Wang, Y.; Jiang, L.; Wu, X.Y.; Zhang, Z.; *et al.* Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 40(1), 190-196. <http://doi:10.1016/j.jpba.2005.06.034>. Epub 2005 Aug 26.

Stiti, N.; Triki, S.; Hartmann, M.A. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids*. 2007, 42(1), 55-67. . <http://doi:10.1007/s11745-006-3002-8>.

Stiti, N.; Hartmann, M.A. Nonsterol triterpenoids as major constituents of *Olea europaea*. *J. Lipids*. 2012, 2012, 476595. <http://doi:10.1155/2012/476595>.

Terés, S.; Barceló-Coblijn, G.; Benet, M.; Alvarez, R.; Bressani, R.; Halver, J.E.; Escribá, P.V. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. 2008, 105(37), 13811-13816. <http://doi:10.1073/pnas.0807500105>.

Tous M.T.; Romero A.A. Variedades del olivo con especial referencia a Cataluña. Aedos, editores. 1993.

Tsantili, E.; Evangelou, E.; Kiritsakis, A. Botanical characteristics of olive trees: cultivation and growth conditions–defense mechanisms to various stressors and effects on olive growth and functional compounds. . In: Shahidi, F.; Kiritsakis, A.; editors. *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*. John Wiley & Sons Ltd; 2017, p. 295-324. <http://doi:10.1002/9781119135340>.

Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010, 2(12), 1231-1246. <http://doi:10.3390/nu2121231>.

Trujillo, I.; Ojeda, M.A.; Urdiroz, N.M.; Potter, D.; Barranco, D.; Rallo, L.; Diez, C.M. Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genet Genomes*. 2013, 10(1), 1-15. <http://doi:10.1007/s11295-013-0671-3>.

United States Department of Agriculture (USDA). Agricultural Research Service. Consultado en <https://fdc.nal.usda.gov/> [accessed 03 mayo 2020].

Valero-Muñoz, M.; Martín-Fernández, B.; Ballesteros, S.; De la Fuente, E.; Quintela, J.C.; Lahera, V.; De las Heras, N. Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: mechanisms involved. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2014, 58(2), 376-383. <http://doi:10.1002/mnfr.201300256>.

Vazquez, A.; Sanchez-Rodriguez, E.; Vargas, F.; Montoro-Molina, S.; Romero, M.; Espejo-Calvo, J.A.; Vilchez, P.; *et al.* Cardioprotective effect of a virgin olive oil enriched with bioactive compounds in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients.* 2019, 11(8), Article 1728. <http://doi.org/10.3390/nu11081728>.

Xia, E.Q.; Wang, B.W.; Xu, X.R.; Zhu, L.; Song, Y.; *et al.* Microwave-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12(8), 5319-5329. <http://doi:10.3390/ijms12085319>.

Xie, H.; Shen, C.Y.; Jiang J.G. The sources of salidroside and its targeting for multiple chronic diseases. *J. Funct. Food.* 2020, 64, 103648. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103648>.

Yin, M.C.; Lin, M.C.; Mong, M.C.; Lin, C.Y. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J. Agric. Food. Chem.* 2012, 60(31), 7697-7701. <http://doi:10.1021/jf302529x>.

Yu, J.; Kwon, H.; Cho, E.; Jeon, J.; Kang, R.H.; Youn, K.; Jun, M.; Choon, L.Y.; Hoon, R.J.; Hyun, K.D. The effects of pinoreosinol on cholinergic dysfunction-induced memory impairments and synaptic plasticity in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2019, 125, 376–382. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.017>.

Zhang, H.; Jing, F.; Zhang, Z. Development and validation of a quantification method for oleanolic acid and hederagenin in rat plasma: application to the pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2016, 31(2). <http://doi:10.1002/bmc.3801>.

Zrelli, H.; Matsuoka, M.; Kitazaki, S.; Zarrouk, M.; Miyazaki, H. Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK-FOXO3a pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 660(2-3), 275-282. <http://doi:10.1016/j.ejphar.2011.03.045>.

VIII. ANEXO



Journal of Functional Foods

TABLE OLIVE ELICITS ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Olea europaea L.; blood pressure; body weight; spontaneously hypertensive rat
Corresponding Author:	M. Emília Juan, Ph.D. Universitat de Barcelona Barcelona, SPAIN
First Author:	Talia Franco-Ávila
Order of Authors:	Talia Franco-Ávila Rocío Moreno-González, Ph.D. M. Emília Juan, Ph.D. Joana M. Planas, Prof.
Abstract:	<p>Table olives contain oleic acid and minor compounds as pentacyclic triterpenes and polyphenols that could attenuate blood pressure (BP) as described for olive oil. Therefore, we investigate the effect of table olives on BP and body weight in spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive (WKY) controls. Acute (1-day) and long-term (7-weeks) administration of Arbequina table olives did not modify BP in normotensive animals. Conversely, in SHR rats, the single dose provided a transient hypotensive effect from the second to the tenth h after the administration, whereas the regular intake caused an enduring decline of approximately 15 mmHg from the second week to the end of the experiment. No increase in body weight was observed in either SHR or WKY rats. Moreover, pentacyclic triterpenes and polyphenols were analysed in olives and plasma by LC-MS. In conclusion, the present results contribute to raising awareness about table olives as a heart-healthy food.</p>
Suggested Reviewers:	Prokopios Magiatis magiatis@pharm.uoa.gr Josep Antoni Tur Marí pep.tur@uib.es Lluís Serra-Majem lluis.serra@ulpgc.es M. José Motilva motilva@icvv.es Concepción Romero crb@cica.es Antonio Garrido Fernandez garfer@cica.es



Joana M. Planas, PhD
Professor of Physiology

Departament de Bioquímica i Fisiologia,
Facultat de Farmàcia i Ciències de
l'Alimentació

Edifici B, 3ª planta
Av. Joan XXIII, 27-31
E-08028 Barcelona

Tel. +34 93 402 45 05
jmplanas@ub.edu

Editorial Board of the *Journal of Functional Foods*

Barcelona, August 5th, 2021

Dear Editor,

We are pleased to submit a research manuscript entitled “***Table olive elicits antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats***” for consideration by the Editorial Board of the *Journal of Functional Foods*.

The present manuscript evaluates the effect of the consumption of table olives on blood pressure. The rationale arises from the fact that olive oil has been deemed to exert a key role in the primary prevention of cardiovascular disease. Hence, the fruit of *Olea europaea* L. from which the olive oil is obtained could also exert a relevant contribution. To this aim, the effect of the short- (1-day) and long-term (7-weeks) consumption of Arbequina table olives was investigated in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) and their normotensive control Wistar Kyoto rats (WKY). Arbequina table olives were administered in a high dose to provide a sufficient safety margin in the evaluation of whether this food exerts adverse effects on BP and body weight. The present results show that Arbequina table olives did not modify BP in normotensive animals. Conversely, the single dose provided a transient hypotensive effect from the 2nd to the 10th h after the administration, whereas the regular intake caused an enduring decline of approximately 15 mm Hg from the 2nd week to the end of the experiment. No increase in body weight was observed in either SHR or WKY rats. Given that small reductions of systolic BP (10 mm Hg) have been reported to significantly decrease the risk of cardiovascular disease, the present results are relevant to establish the basis for considering table olives as a valuable functional food.

In addition, we would like to indicate that:

- Joana M. Planas (e-mail: jmplanas@ub.edu) and M. Emília Juan (e-mail: mejjuan@ub.edu) are the corresponding authors of this article.
- The name and email address of the other co-authors are:
 - Talia Franco-Ávila: taliafranco@ub.edu
 - Rocío Moreno-González: rociomorenogonzalez@ub.edu
- The corresponding authors as well as all the authors have read and approved the final submitted manuscript
- No portion of the work has been or is currently under consideration for publication elsewhere

- The sources of funding for research have been reported on the manuscript
- The manuscript contains experiments using animals that were conducted strictly following the Guidelines established by the European Community. The experimental procedure was approved by the Ethic Committee of Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona (Ref. 105/17) and by the Generalitat de Catalunya (Ref. 9468).

Looking forward to hearing from you soon, I remain,

Yours faithfully,



Joana M. Planas

HIGHLIGHTS

- Olives contain oleic acid and minor compounds that could reduce blood pressure (BP)
- The effect on BP was assessed in normotensive (WKY) and hypertensive (SHR) rats
- Table olives did not modify BP in WKY while a hypotensive effect was found in SHR
- The present results contribute to consider table olives as a heart-healthy food.

1
2
3
4
5 1 **TABLE OLIVE ELICITS ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY IN SPONTANEOUSLY**
6
7 2 **HYPERTENSIVE RATS**
8
9

10 3
11
12
13 4 *Talia Franco-Ávila, Rocío Moreno-González, M. Emília Juan* and Joana M. Planas**
14
15
16 5

17
18
19 6 Departament de Bioquímica i Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària
20
21 7 (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Av. Joan XXIII 27-31, 08028-Barcelona (Spain).
22
23

24 8
25
26 9 **E-mail addresses:** TFA: taliafranco@ub.edu
27
28
29 10 RMG: rociomorenogonzalez@ub.edu
30
31 11 MEJ: mejuaan@ub.edu
32
33 12 JMP: jmplanas@ub.edu
34
35

36 13 **Corresponding authors:** Departament de Bioquímica i Fisiologia
37
38 Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
39 14
40 Universitat de Barcelona
41 15
42 Av. Joan XXIII 27-31,
43 16
44 08028-Barcelona
45
46 17
47 Phone: +34934024505
48
49 18
50 e-mail: mejuaan@ub.edu (M.E. Juan)
51 19
52
53 20 e-mail: jmplanas@ub.edu (J.M. Planas)
54
55
56 21
57
58
59 22
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

23 **ABSTRACT**

24 Table olives contain oleic acid and minor compounds as pentacyclic triterpenes and polyphenols
25 that could attenuate blood pressure (BP) as described for olive oil. Therefore, we investigate the
26 effect of table olives on BP and body weight in spontaneously hypertensive rats (SHR) and their
27 normotensive (WKY) controls. Acute (1-day) and long-term (7-weeks) administration of
28 Arbequina table olives did not modify BP in normotensive animals. Conversely, in SHR rats, the
29 single dose provided a transient hypotensive effect from the 2nd to the 10th h after the
30 administration, whereas the regular intake caused an enduring decline of approximately 15 mmHg
31 from the 2nd week to the end of the experiment. No increase in body weight was observed in either
32 SHR or WKY rats. Moreover, pentacyclic triterpenes and polyphenols were analysed in olives and
33 plasma by LC-MS. In conclusion, the present results contribute to raising awareness about table
34 olives as a heart-healthy food.

36 **Keywords:** *Olea europaea* L., blood pressure, body weight, spontaneously hypertensive rat

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

38 **1. Introduction**

39 Hypertension is considered one of the main preventable factors of cardiovascular disease burden
40 and mortality worldwide (Zhou, Perel, Mensah, & Ezzati, 2021). The adoption of a healthy lifestyle
41 and high-quality dietary patterns, such as those provided by the Mediterranean Diet, could afford
42 considerable benefit as prevention and help treatment of hypertension as well as cardiovascular
43 diseases (Ozemek, Laddu, Arena, & Lavie, 2018; De Pergola & D’Alessandro, 2018; Islam *et al.*,
44 2021). This eating pattern is characterized among others, by a high consumption of vegetables,
45 fruits, legumes along with the ingestion of the products of *Olea europaea* L., namely olive oil, and
46 table olives (Serra-Majem *et al.*, 2020). Among the foods recognized as being heart-healthy, stands
47 out extra virgin olive oil that has been deemed to exert a key role in the primary prevention of
48 cardiovascular diseases in nutritional interventions (Estruch *et al.*, 2018) as well as in preclinical
49 studies (Terés *et al.*, 2008; Vazquez *et al.*, 2019). In this context, the fruit of *Olea europaea* L.,
50 from which olive oil is obtained, could exert a relevant contribution to health. Table olives have
51 been explicitly included in the second level of the Mediterranean diet pyramid with a recommended
52 daily consumption of one or two portions (15-30 g) (Serra-Majem *et al.*, 2020). The
53 recommendation of the daily intake of table olives as a healthy snack choice arises from the high
54 content in monounsaturated lipids that yields to a balanced profile of monounsaturated/saturated
55 fatty acids (Serra-Majem *et al.*, 2020). Furthermore, this food could contribute to the general well-
56 being not only for its elevated content in oleic acid but also in minerals, vitamins, and fiber along
57 with other minor components such as polyphenols and pentacyclic triterpenes (Rocha, Borges, &
58 Pinho, 2020). Regarding phytochemicals, hydroxytyrosol is the main polyphenol in all types of
59 table olives (Rocha *et al.*, 2020), and holds a claim on cardiovascular health stated by EFSA (Reg.
60 EU n.432/2012). The claim acknowledges that the daily consumption of 5 mg of hydroxytyrosol

1
2
3
4 61 and its derivatives (e.g., oleuropein complex and tyrosol) per 20 g of olive oil contributes to the
5
6 62 protection of blood lipids from oxidative stress (Reg. EU n.432/2012). Studies performed in our
7
8
9 63 group with different table olives have indicated that the Arbequina variety contains important
10
11 64 concentrations of polyphenols, and the consumption of 9-small sized olives could provide the
12
13
14 65 amount of hydroxytyrosol, and derivatives stated in the health claim (Moreno-González, Juan, &
15
16 66 Planas, 2020). In addition, these number of olives would supply 25 mg of maslinic acid and 7 mg
17
18
19 67 of oleanolic acid (Moreno-González *et al.*, 2020), which are pentacyclic triterpenes, that also exert
20
21 68 multiple biological activities (Sánchez-Quesada *et al.*, 2013).

22
23
24 69 Notwithstanding the undeniable nutritional value of table olives and their relevant content of
25
26 70 phytochemicals there is a lack of knowledge of the effect of the regular consumption in health.
27
28
29 71 Consequently, the aim of the present study was to investigate the consequence of the ingestion of
30
31 72 table olives on BP and body weight of Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) and their
32
33
34 73 normotensive control Wistar Kyoto rats (WKY). The experimental model requires no intervention
35
36 74 to induce hypertension and its pathophysiology is similar to the essential hypertension in humans
37
38
39 75 (Lerman *et al.*, 2019). The dose administered to the rats was the equivalent to the human
40
41 76 consumption of 30 Arbequina table olives that were given as a single dose or as a daily
42
43
44 77 administration throughout 7 weeks to establish the effect at short and long-term of the intake of the
45
46 78 fruit of *Olea europaea* L.

49 79 **2. Materials and methods**

53 80 *2.1. Animals*

54
55
56 81 Male SHR (n = 15) and their normotensive genetic control WKY (n = 13) rats were purchased from
57
58
59 82 Envigo Laboratories (Huntingdon, United Kingdom) at 9-week-old and were quarantined for 1
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 83 week. Animals were kept in groups of 2 rats per cage under controlled conditions of room
5
6 84 temperature (22 ± 2 °C), humidity ($50 \pm 10\%$) and light-dark cycle of 12 h. Rats were fed a standard
7
8
9 85 diet (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona, Spain) and water *ad libitum*.

10 11 12 86 *2.2. Experimental design and dose preparation*

13
14
15
16 87 After the quarantine and for 2 weeks WKY and SHR rats were orally administered by gavage with
17
18 88 water and blood pressure was measured daily as an adaptation period. Afterwards, animals were
19
20
21 89 randomly distributed into control group (WKY control, n = 6; SHR control, n = 7) and olives group
22
23 90 (WKY olives, n = 7; SHR olives, n = 8). In all groups, the oral dosing was carried out by gavage
24
25
26 91 using a stainless-steel animal feeding tube (18 gauge \times 76 mm, ref. FTSS-18S-76, Instech
27
28 92 Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) at a volume of administration of 10 mL/kg.
29
30
31 93 Control animals only received water while those in the olive group were treated with Arbequina
32
33 94 table olives at a dose of 3.85 g/kg.

34 35 36 95 *2.2.1. Dose preparation*

37
38
39 96 Table olives of the Arbequina variety (Cooperativa del Camp, Maials, Lleida) from the 2016-2017
40
41
42 97 harvest were processed following the Greek style which consisted in a natural fermentation in
43
44 98 brine. The dose of 3.85 g of destoned olives/kg of body weight is equivalent to the intake of 30
45
46
47 99 Arbequina table olives by a person according to the body surface area normalization method
48
49 100 described by (Reagan-Shaw, Nihal, & Ahmad, (2008). The olives were administered as a finely
50
51
52 101 grinded homogeneous suspension. Therefore, destoned olives were mixed with Milli-Q water and
53
54 102 were carefully grinded with a Polytron homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) using
55
56
57 103 a 20 TS arm by means of 6 cycles of 30 s at a speed set at 5. The olive suspension was prepared
58
59 104 every two days and was kept at 4°C in a 50 mL conical tube tightly closed and protected from light
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

105 by an aluminium foil. An aliquot of each homogenous olive suspension was stored at -20°C
106 protected from light until the analysis of polyphenols and pentacyclic triterpenes by LC-MS.

107 *2.2.2. Experiment 1: Effect of a single dose of table olives on blood pressure*

108 The acute effect of Arbequina table olives was evaluated in WKY and SHR rats aged 12 weeks.
109 BP was measured between 8 and 10 a.m. Then, animals received by gavage a single oral dose of
110 3.85 g/kg of Arbequina table olives or water, and BP was determined at 2, 4, 6, 8, 10- and 24-hours
111 post administration.

112 *2.2.3. Experiment 2: Effect of the repeated ingestion of table olives for 49 days*

113 A washout period of 2 weeks was allowed after the completion of the acute experiment. BP was
114 recorded in WKY and SHR rats prior to the first oral administration. Then, BP was measured once
115 a week for 7 weeks between 8 and 10 a.m. to minimize the effects of any circadian rhythm. The
116 oral administration of animals with 3.85 g/kg of Arbequina table olives or water was performed
117 daily between 17 and 18 p.m. Hence, BP was assessed 15 – 17 h after the last oral administration.
118 Body weight was monitored daily, whereas water and food intake were assessed once a week.

119 *2.3. Blood pressure measurements*

120 BP was measured in conscious rats by the tail-cuff method using the non-invasive blood pressure
121 system for rodents (LE5001 Harvard Apparatus, Panlab, Barcelona, Spain). Animals were
122 restrained in a holder and were kept at 30°C for 10 min to make the pulsations of the tail artery
123 detectable. To avoid stress-induced variations, all the BP determinations were taken by the same
124 person in a peaceful environment. Once the cuffs were attached to the tail, a stabilization period of

1
2
3
4 125 5-10 min were followed prior to the acquisition of systolic, diastolic, and mean BP. The mean of
5
6 126 at least 7 measurements within a range of 5 - 10 mm Hg were considered as the final reading.
7
8
9

10 127 *2.4. Gross necropsy and sample collection*

11
12

13 128 Following the last BP measurement obtained after 7 weeks of treatment, overnight fasted rats were
14
15
16 129 anesthetized by intramuscular injection of ketamine (Imalgene®; Merial, Lyon, France) and
17
18 130 xylacine (Rompun®; Bayer Hispania SL, Sant Joan Despí, Spain) at the concentrations of 90 and
19
20
21 131 10 mg/kg, respectively. Blood extracted by cardiac puncture was transferred to tubes with EDTA-
22
23 132 K₃. Plasma was obtained by centrifugation at 1500×g for 15 minutes at 4°C (Centrifuge Megafuge
24
25
26 133 1.0, Heraeus, Boadilla, Spain) and was immediately stored at -20°C until the analysis of
27
28 134 polyphenols and pentacyclic triterpenes by LC-MS.

29
30
31 135 Immediately after blood withdrawal, liver, kidneys, heart, spleen, and lungs were excised and
32
33 136 trimmed of any adherent tissue. The adipose depots (omental, left epididymal pad and left
34
35
36 137 retroperitoneal pad) were collected as previously described by Johnson & Hirsch (1972). The
37
38 138 dissected tissues were washed in saline solution, slightly blotted in filter paper, and immediately
39
40
41 139 weighted to obtain the wet weight. Results were expressed as mg of organ/g of body weight.
42
43

44 140 *2.5. Determination of pentacyclic triterpenes and phenolic compounds in animal feed and* 45 46 141 *Arbequina table olives*

47
48
49

50 142 Pentacyclic triterpenes and phenolic compounds were determined following a previously reported
51
52 143 procedure (Moreno-González *et al.* 2020) in 6 independent olive suspensions prepared in different
53
54
55 144 days along the 7 weeks of treatment and 3 independent samples of animal feed. Concisely, 1 g of
56
57 145 the olive suspension or 1 g of grinded animal feed was extracted with 6 mL of methanol-ethanol
58
59
60 146 (1:1; v/v) containing betulinic acid as IS for pentacyclic triterpenes and 2-(3-hydroxyphenyl)

1
2
3
4 147 ethanol as IS for polyphenols. The mixture was vigorously stirred in a vortex for 5 min, ensuing
5
6 148 by centrifugation at 3345×g for 30 min at 4°C (Megafuge 1.0R, Heraeus, Boadilla, Spain). The
7
8
9 149 supernatant was separated, and two additional extractions of the pellet were performed using 3 mL
10
11
12 150 of methanol-ethanol (1:1; v/v). Then, the three supernatants were pooled and centrifuged at
13
14 151 25000×g for 30 min at 2°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes,
15
16 152 Spain). Finally, pentacyclic triterpenes were analysed by LC-APCI-MS and phenolic compounds
17
18
19 153 by LC-ESI-MS/MS (Moreno-González *et al.* 2020).
20
21

22 154 *2.6. Analysis of pentacyclic triterpenes and polyphenols in plasma*

23
24
25

26 155 Plasma samples obtained 15 to 17 h after the oral administration of 3.85 g of destoned olives/kg of
27
28 156 body weight for 49 days were analysed as previously described (Kundisová, Juan, & Planas, 2020).
29
30
31 157 Before analysis, calibration standards were freshly made using 190 µL of blank plasma spiked with
32
33 158 10 µL of working standards of pentacyclic triterpenes and polyphenols to a final concentration of
34
35
36 159 0; 1; 2.5; 5; 10; 15; 20 and 25 nM. Briefly, calibration standards and plasma samples (200 µL) were
37
38 160 added with 10 µL of ascorbic acid (10%; w/v) and 10 µL of acetic acid (1%; v/v). In addition, 10
39
40 161 µL of betulinic acid (2 µM) was incorporated as IS of pentacyclic triterpenes, whereas 10 µL of 2-
41
42
43 162 (3-hydroxyphenyl) ethanol (10 µM) was aggregated as IS of phenolic compounds and were stirred
44
45 163 in a vortex for 2 s. Then, samples were diluted with 2 mL of ethyl acetate, vigorously vortex-mixed
46
47
48 164 for 5 min, placed into an ultrasonic bath for 10 min and centrifuged at 1500×g at 2°C for 10 min
49
50 165 (Megafuge 1.0R). The pellet was submitted to a second extraction with 2 mL of ethyl acetate.
51
52
53 166 Finally, the two supernatants were combined and 10 µL of 10% ascorbic acid was added before
54
55 167 evaporation to dryness using a Concentrator 5031 (Eppendorf Ibérica S.L.). The reconstitution of
56
57 168 the residue was carried out with 100 µL of methanol 80% (v/v), vigorous agitation in the vortex
58
59
60 169 for 5 min and ultrasonic bath for 2 min. The solution was centrifuged at 25000×g for 30 min at 4
61
62
63
64
65

1
2
3
4 170 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L.) to obtain a clear supernatant that was deposited into
5
6
7 171 amber vials for a straightforward LC-MS analysis. Pentacyclic triterpenes were determined by LC-
8
9 172 APCI-MS (Moreno-González *et al.* 2020) and phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS
10
11 173 (Kundisová *et al.* 2020). The method was validated using blank plasma spiked with analytes (EMA,
12
13
14 174 2011), showing adequate linearity ($R^2 > 0.996$), precision and accuracy lower than 15%, absence of
15
16 175 matrix effect and carry over. The limits of quantification (LOQ) for the pentacyclic triterpenic acids
17
18
19 176 and alcohols were lower than 0.33 nM and 7.39 nM, respectively. Polyphenols had LOQ ranging
20
21 177 from 0.08 nM (luteolin) to 5.21 nM (vanillic acid), except tyrosol (10.26 nM) and hydroxytyrosol
22
23
24 178 acetate and catechol (25 nM).

27 179 *2.7. Statistical analysis*

28
29
30 180 Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Chauvenet's criterion was
31
32
33 181 applied to identify and to reject outliers. Statistical analysis and elaboration of graphs was
34
35
36 182 performed in Prism version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Normality of the data
37
38 183 was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test. The analysis of BP, body weight, and the weight
39
40 184 of the organs was carried out by two-way ANOVA followed by Fisher LSD *post hoc* test. Values
41
42
43 185 of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

46 186 **3. Results**

50 187 *3.1. Experiment 1: Effect of a single dose of table olives on blood pressure*

51
52
53
54 188 The acute experiment was performed in 12-week-old animals. The WKY rats weighted 252 ± 3.31
55
56 189 g ($n = 13$) and the SHR animals were 261 ± 2.49 g ($n = 15$).

60 190 *3.1.1. Blood pressure in normotensive WKY rats*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

191 The average BP at time 0 hours yielded normotensive values for systolic (140.8 ± 1.7 mm Hg; $n =$
192 13) and diastolic measurements (97.1 ± 1.9 mm Hg; $n = 13$) in both control and treated rats (Figure
193 1A). The oral administration of Arbequina table olives induced a small non-significant decrease in
194 systolic and diastolic BP, that was maximum at 4 hours with a reduction of 4.1% ($p > 0.05$) in
195 systolic and 5.7% ($p > 0.05$) in diastolic BP when compared to the control group (Figure 1A).
196 Similar results were found for mean BP (Figure 1C).

197 *3.1.2. Blood pressure in hypertensive SHR rats*

198 The average initial values of systolic (200.3 ± 1.4 mm Hg; $n = 15$) and diastolic BP (159.4 ± 1.1
199 mm Hg; $n = 14$) indicated that hypertension was established in SHR rats. Throughout the 24 hours
200 of the acute study, BP remained similar in the animals that were orally administered with water
201 (Figure 1B). In contrast, the oral intake of Arbequina table olives induced a statistically significant
202 decline of $6.95 \pm 0.32\%$ ($p < 0.05$) in systolic and $9.66 \pm 0.43\%$ in diastolic BP from 2 to 10 hours
203 when compared to the control group (Figure 1B). The median BP showed the same pattern as
204 described for systolic and diastolic BP in the control and olives groups (Figure 1C). At 24 h, BP
205 values did not differ from the basal except for the systolic BP of the SHR olive group.

206 *3.2. Experiment 2: Effect of the repeated ingestion of table olives for 49 days*

207 *3.2.1. Body weight and food and water consumption*

208 The chronic study started at 14-week-old animals after a washout period of two weeks. In the WKY
209 control group, the initial body weight was 274 ± 7.48 g ($n = 6$) and after 7 weeks increased to 346
210 ± 11.83 g ($n = 6$) (Figure 2). A similar growth was observed in the WKY olive group, since the
211 body weight changed from 272 ± 4.95 g ($n = 7$) to 347 ± 6.87 g ($n = 7$) after 49 days of treatment.
212 Concerning the hypertensive strain, animals in the control group grew from 270 ± 5.40 g ($n = 7$) to

1
2
3
4 213 322 ± 6.14 g (n = 7) after 7 weeks while the body weight in the SHR animals receiving olives
5
6
7 214 varied from 274 ± 6.44 g (n = 8) to 326 ± 7.98 g (n = 8) at the end of the experiment (Figure 2).
8
9
10 215 The weight gain was 72 ± 6 g in the control WKY group (1.47 g/day), 75 ± 3 g in the WKY olives
11
12 216 (1.53 g/day), 52 ± 4 g in the SHR control (1.06 g/day) and 51 ± 6 g in the SHR olives (1.04 g/day).
13
14 217 The total weight gain of the control SHR rats was a 30% lower ($p < 0.05$) than the one found in the
15
16
17 218 WKY control group. Within the same strain no differences were found between groups.
18
19
20 219 The mean daily food consumption per rat was 18.1 ± 0.1 g/day in the WKY control, 17.9 ± 0.1
21
22 220 g/day in the WKY olives, 17.8 ± 0.1 g/d in the SHR control and 17.7 ± 0.1 g/day in the SHR olives.
23
24
25 221 No statistically significant differences in food consumption were observed between control and
26
27 222 treated groups.
28
29
30 223 Finally, the mean daily water consumption per rat was 24.6 ± 0.3 mL/day in the WKY control and
31
32 224 25.5 ± 0.4 mL/day in the WKY olives, whereas in the SHR control and SHR olives were 36.5 ±
33
34
35 225 0.6 mL/day and 37.5 ± 0.6 mL/day, respectively. The water intake in the hypertensive rats was
36
37 226 around 32% higher than in the normotensive animals ($p < 0.05$). Within each strain, no statistically
38
39
40 227 significant difference was found in water consumption between the control and the treated animals.
41
42

43 228 3.2.2. Blood pressure in normotensive WKY rats

44
45
46 229 The chronic study starts with 14-week-old rats that on day 1 hold similar systolic (148.1 ± 2.1 mm
47
48
49 230 Hg; n = 13) and diastolic BP (100.3 ± 5.1 mm Hg; n = 13) in both the control and olives groups
50
51 231 (Figure 3A). No significant differences were found when systolic and diastolic BP in the WKY
52
53
54 232 olives were compared to the control group. However, the measurements of diastolic BP in the
55
56 233 treated rats showed a non-significant decrement of approximately 6.75% at the sixth and seventh
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 234 week. Mean BP measured during the 49 days of the experiment followed the same pattern as
5
6
7 235 described for systolic and the diastolic BP.
8
9

10 236 *3.2.3. Blood pressure in hypertensive SHR rats*

11
12
13 237 In control SHR rats, systolic BP was 213.5 ± 3.5 mm Hg on day 1, and throughout the chronic
14
15 238 experiment showed a non-significant mild but sustained increase with values of 224.1 ± 5.0 mm
16
17
18 239 Hg on the seventh week. In the same group, diastolic BP presented a similar pattern, ranging from
19
20 240 166.9 ± 3.7 mm Hg on day 1 to 174.2 ± 4.7 mm Hg on day 49 (Figure 3B).
21
22

23 241 The oral administration of Arbequina table olives induced a statistically significant reduction of
24
25 242 $7.1 \pm 0.2\%$ ($p < 0.05$) in systolic and $8.01 \pm 0.56\%$ ($p < 0.05$) in diastolic BP from day 14 to day
26
27
28 243 49 when compared to the control animals (Figure 3B). Finally, the mean BP in hypertensive rats
29
30 244 reflects the changes described for the systolic and diastolic BP in both the control and olives groups
31
32
33 245 (Figure 3C).
34
35

36 246 *3.2.4. Gross necropsy*

37
38
39 247 The repeated oral administration of Arbequina table olives at a dose of 3.85 g/kg for 49 days did
40
41
42 248 not induce any adverse effects or mortality during the experimental period neither in normotensive
43
44 249 nor in hypertensive rats. A thorough post-mortem assessment of the internal organs was performed
45
46
47 250 at the end of the chronic study. No macroscopic differences in colour, size or texture were observed
48
49 251 in the different groups.
50
51

52 252 The final relative weights (mg/g body weight) of kidney, liver, heart, spleen, lungs, and fat depots
53
54 253 was not affected by the daily oral administration of table olives compared to the control group
55
56
57 254 within each strain (Table 1). However, differences between strains were found. The relative
58
59 255 weights of the liver, heart, and spleen of the SHR control were a 24.5%, 26.0% and 14.0% higher
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 256 compared to the WKY control ($p < 0.01$). Conversely, the epididymal pad showed a lower relative
5
6 257 weight in the SHR control when compared to the WKY control ($p < 0.01$) animals.
7
8
9

10 258 *3.3. Pentacyclic triterpenes and polyphenols in Arbequina table olives*

11
12

13 259 The analysis of Arbequina table olives enabled the identification and quantification of 3 pentacyclic
14
15
16 260 triterpenes and 15 phenolic compounds. Pentacyclic triterpenes were the most abundant with a total
17
18 261 content of 3214 ± 123 g/kg, ahead of 1043 ± 46.9 g/kg for polyphenols (Table 2). The main
19
20
21 262 pentacyclic triterpene was maslinic acid that accounted for a 72.9%. Concerning polyphenols, the
22
23 263 highest concentrations corresponded to hydroxytyrosol, verbascoside and luteolin which accounted
24
25
26 264 for the 86% of this group of bioactive compounds (Table 2).
27
28

29 265 *3.4. Pentacyclic triterpenes and polyphenols and in the commercial diet*

30
31

32 266 No pentacyclic triterpenes were detected in the animal feed. Most of the polyphenols were also
33
34
35 267 absent and only small amounts of *p*-coumaric acid, vanillic acid and caffeic acid and were found
36
37
38 268 (Table 2).
39
40

41 269 *3.5. Concentrations of pentacyclic triterpenes and polyphenols in plasma*

42
43

44 270 The plasma samples from rats in the WKY and SHR olive groups contained four main bioactive
45
46
47 271 compounds from olives, namely, maslinic acid, oleanolic acid, hydroxytyrosol and luteolin (Table
48
49
50 272 2). The higher plasmatic concentrations corresponded to pentacyclic triterpenes. Maslinic acid was
51
52 273 found at 3.13 ± 0.85 nM and 3.51 ± 1.10 nM in the rats from the groups WKY olives and SHR
53
54 274 olives, respectively. Oleanolic acid hold values of 1.08 ± 0.19 nM and 1.34 ± 0.40 in the
55
56
57 275 normotensive and hypertensive rats that were orally administered with olives. Regarding
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

276 polyphenols, only hydroxytyrosol and luteolin were found in plasma at concentrations below 1 nM
277 (Table 2).

278 **4. Discussion**

279 The regular intake of table olives could ameliorate human health not only for their important
280 nutritional content but also for the high presence of different bioactive compounds (Boskou, 2017;
281 Rocha *et al.*, 2020; Serra-Majem *et al.*, 2020). Consequently, table olives are started to be regarded
282 as a healthy appetizer and its consumption continues to grow worldwide (Rocha *et al.*, 2020).
283 However, despite the unquestionable nutritional value of this food, there are still two relevant
284 aspects for the consumer's health that needed to be clarified, and constitute the aim of the present
285 study, the effect of table olives on BP due to their salt content and in body weight for being lipids
286 a major component. Here, Arbequina variety was used given that previous studies (Moreno-
287 González *et al.*, 2020) showed that 9-small sized Arbequina table olives could provide the 5 mg of
288 hydroxytyrosol, and derivatives stated by the health claim of the European Union (Reg. EU n°
289 432/2012) to protect blood lipids against oxidation (Moreno-González *et al.*, 2020). The dose
290 administered to the rats was chosen considering that a handful of table olives are deemed a
291 reasonable consumption as a healthy snack (Serra-Majem *et al.*, 2020), which corresponds to the
292 intake of approximately 15-small sized Arbequina table olives. Therefore, we selected 3.85 g/kg
293 which is a dose equivalent to a human ingestion of 30 Arbequinas to provide a sufficient safety
294 margin in the assessment of whether table olives exert adverse effects on BP and body weight. The
295 effects of Arbequina table olives were evaluated in an animal model extensively employed in
296 physiological studies relating to hypertension. WKY rats were used to assess the effect on the
297 control group, whereas SHR were employed as a suitable animal model of primary hypertension
298 (Lin, Lee, Chan, & Tse, 2016). This model holds similarities to the development of human essential

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

hypertension comprising a genetic susceptibility to elevated BP with no specific aetiology that accounts for 90-95% of human adult cases (Lerman *et al.*, 2019). At 12-week-old, the systolic BP was 200 ± 3.9 mm Hg ($n = 15$) and diastolic 159 ± 1.1 mm Hg ($n = 15$), showing that the SHR rats suffered from hypertension, while WKY displayed normotensive systolic (141 ± 1.7 mm Hg; $n = 13$) and diastolic (97 ± 1.9 mm Hg; $n = 13$) values. These values agree with the ones reported for both strains at this age (Maris, Melchert, Joseph, & Kennedy, 2005).

An acute study was performed to obtain information about the effects of Arbequina table olives on BP in a short time. Our results showed that the single administration did not modify neither systolic nor diastolic BP on normotensive animals. However, table olives exerted an antihypertensive effect in SHR rats when compared to the SHR controls from the 2nd to the 10th h with a decrease of 14.9 ± 1.7 mm Hg ($n = 37$) and 15.8 ± 1.8 mm Hg ($n = 37$) in systolic and diastolic BP. There are no studies in the literature showing the acute effect of derivatives of *Olea europaea* L. in an animal model of hypertension. However, Terés *et al.* (2008) administered a single dose of 2 g/kg of virgin olive oil to Sprague-Dawley rats and found a reduction in BP at 2 h and 4 h post-administration. This lowering action on BP was attributed to the high concentration of oleic acid that proceeds through a mechanism of action based on the rapid regulation of membrane lipid structure and cell signaling in vascular cells (Terés *et al.*, 2008).

To deepen into the subject, a chronic study throughout 7 weeks was conducted where we found a decline of systolic BP of 15.6 ± 2.2 mm Hg ($n = 45$) when compared to the control. In addition, diastolic BP dropped 13.7 ± 1.9 mm Hg ($n = 45$) from the second week to the end of the experiment. Therefore, the intake of a dose equivalent to a human consumption of 30 Arbequina olives did not modify BP in normotensive WKY and elicited an antihypertensive effect in SHR, in both acute and chronic experiments. Hence, the results obtained in our study could be relevant to human health,

1
2
3
4 322 since it has been described that a relatively small reduction in systolic BP (10 mm Hg) significantly
5
6
7 323 lowered the risk of major cardiovascular disease events, coronary heart disease, stroke, and heart
8
9 324 failure (Ettehad *et al.*, 2015). However, the complex composition of table olives hinders the
10
11 325 elucidation of the mechanisms involved in the amelioration of BP observed in SHR rats as well as
12
13
14 326 to ascribe the activity to a particular component. Other studies carried out in the same experimental
15
16 327 model have also shown an antihypertensive effect using different derivatives from *Olea europaea*
17
18
19 328 *L.* (Terés *et al.*, 2008; Valero-Muñoz *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2016; Vázquez *et al.*, 2019).
20
21 329 Among the hypotensive components highlighted by these authors stand out oleic acid, polyphenols
22
23
24 330 and pentacyclic triterpenes. The role of oleic acid has been pointed out by Terés *et al.* (2008) after
25
26 331 the administration of 2 g/kg of virgin olive oil every 12 hours for 14 days. A significant and
27
28
29 332 progressive reduction of systolic BP was observed in SHR rats as early as 4 days after the start of
30
31 333 the treatment. Oleic acid has been described to elicit rather quick adaptive processes yielding an
32
33
34 334 enhancement in the production of vasodilator mediators along with a restriction of vasoconstriction
35
36 335 pathways yielding to the observed hypotensive activity (Terés *et al.*, 2008). Although oleic acid
37
38
39 336 represents a 70-80% of lipids in both table olives and olive oil, the content of fat in both foods is
40
41 337 slightly different. While olive oil contains a 99% of lipids (Jiménez-López *et al.*, 2020), the values
42
43 338 drop to 6-30% in table olives (Rocha *et al.*, 2020). Given that the Arbequina variety hold a 21.2%
44
45
46 339 of fat, the dose of oleic administered to rats was 0.65 g/kg, which is an 80% lower to the one
47
48 340 administered daily by Terés *et al.*, (2008) that corresponded to 3.17 g/kg. Therefore, the low
49
50
51 341 concentration of oleic acid in table olives could hardly explain the antihypertensive activity
52
53 342 observed after their ingestion, and other minor compounds could possibly also be involved.
54
55 343 Vázquez *et al.* (2019) were not able to find a hypotensive effect in the same animal model after the
56
57
58 344 administration for 8 weeks of 1 mL/rat/day of an extra virgin olive oil (EVOO) containing oleic
59
60 345 acid at a dose of 1.98 mg/kg and a low content of polyphenols (17.6 mg/kg), although a decrease
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

346 in vasoconstrictor biomarkers and an increase of vasodilatory nitric oxide was reported. However,
347 the same oil enriched with 750 mg/kg of phenolic compounds (mainly hydroxytyrosol, 3,4-
348 dihydroxyphenylglycol, and oleuropein) triggered a progressive reduction in systolic BP of SHR
349 rats from the 5th week until the 8th week, that was attributed to an improvement of the endothelial
350 dysfunction and a decreased oxidative status (Vázquez *et al.*, 2019). It is worth mentioning the fact,
351 that under our experimental conditions, table olives prompted the antihypertensive activity in SHR
352 animals already at the 2nd week, which implies a faster effect than the one observed with the
353 enriched EVOO and could be in part related to the polyphenol content. In our study the Arbequina
354 variety contained 1043 mg polyphenols/kg thus supplying a dose of 4.01 mg/kg, which is double
355 to the one given with the enriched olive oil that approximately was 1.88 mg/kg (Vázquez *et al.*,
356 2019). Furthermore, the content of pentacyclic triterpenes should not be underestimated since,
357 Arbequina olives hold 3214 mg/kg. Hence, SHR rats received a dose of 12.4 mg/kg of these
358 bioactive compounds that had also been deemed to play an antihypertensive activity in the same
359 animal model (Valero-Muñoz *et al.*, 2014). In this sense, the administration for 8 weeks to SHR
360 animals of a pomace oil concentrated in triterpenic acids that were given at a dose of 100 mg/kg
361 (56.8% oleanolic acid and 38% maslinic acid) not only reduced BP but also improved the
362 expression of endothelial nitric oxide synthase, ameliorated endothelial dysfunction, as well as
363 diminished the expression of inflammatory and fibrotic mediators in aorta (Valero-Muñoz *et al.*,
364 2014). Although this study is relevant in demonstrating the potential cardiovascular benefits of a
365 pomace olive oil enriched in pentacyclic triterpenes, the supplementation in maslinic and oleanolic
366 acids is closer to a pharmacological regime than to a nutritional pattern. Finally, the involvement
367 of bioactive compounds from *Olea europaea* L. in lowering BP has been supported by Romero *et*
368 *al.* (2016). The administration to SHR for 5 weeks of a dose of 30 mg/kg of olive leaf extract
369 containing oleuropein (4.5 mg/kg), triterpenic acids (3 mg/kg) and hydroxytyrosol (0.3 mg/kg)

1
2
3
4 370 decreased systolic BP from the 3rd to the 5th weeks of treatment, compared to the control that only
5
6
7 371 received water (Romero *et al.*, 2016). The attenuation of high BP in SHR animals was ascribed to
8
9 372 an enhancement of vascular function related to decrease in inflammation and oxidative markers.
10
11
12 373 Given the key role that pentacyclic triterpenes and polyphenols may play in lowering BP, these
13
14 374 compounds were determined not only in Arbequina table olives but also in plasma withdrawn 15 -
15
16
17 375 17 h after the last administration that corresponds to the time interval in which BP was measured.
18
19 376 At this sampling time, only the main bioactive compounds found in olives are present in plasma.
20
21
22 377 Maslinic acid present in table olives at 2341 ± 82.2 mg/kg was quantified in plasma at low amounts
23
24 378 in both WKY (3.13 ± 0.85 nM) and SHR (3.51 ± 1.10 nM). Oleanolic acid, the second most
25
26
27 379 abundant pentacyclic triterpene-in Arbequina table olives with amounts of 862 ± 44.0 mg/kg was
28
29 380 also determined in plasma in concentrations of approximately 1 nM. In addition, hydroxytyrosol
30
31
32 381 which is the higher polyphenols in the fruit of *Olea europaea* L. accounting for 475 ± 11.8 mg/kg
33
34 382 and luteolin with values of 89.6 ± 3.0 mg/kg were the only phenolic compounds quantified in
35
36 383 plasma at concentrations lower than 1 nM. Therefore, Arbequina table olives not only supplies
37
38
39 384 oleic acid but also a large number of phytochemicals with cardioprotective activities that are still
40
41 385 present 15 – 17 h post-administration.
42
43
44 386 Finally, the possible impact of the regular eating of table olives in body weight was also considered.
45
46
47 387 The energy content of 100 g of edible portion ranges from 180 to 250 kcal (Rocha *et al.*, 2020) and
48
49 388 in the Arbequina from the present study were 211 kcal, according to the producer. In the olive
50
51
52 389 groups the mean daily intake of Arbequinas in both strains was 1.2 ± 0.01 g, thus implying a supply
53
54 390 of 2.5 ± 0.03 kcal. The food ingestion was similar in the WKY (18.0 ± 0.1 g/day; n = 13) and SHR
55
56 391 animals (17.8 ± 0.1 g/day; n = 15) with a mean caloric intake of 52.4 ± 0.3 kcal/day and 51.6 ± 0.3
57
58
59 392 kcal/day. Hence, the daily oral administration for 49 days of a dose equivalent to the human
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 393 consumption of 30 Arbequinas although increasing the calories in approximately 5% with respect
5
6
7 394 to the control groups did not affect the final body weight or the mean growth rate, neither in
8
9 395 normotensive WKY animals nor in hypertensive SHR rats. There is no data on the literature about
10
11 396 the effects of table olives on body weight, but there is data on *Olea europaea* L. by-products. In
12
13
14 397 this sense, in the SHR strain no differences in the body weight of treated animals with respect to
15
16 398 the control group were observed after the oral administration of pomace olive oil concentrated in
17
18
19 399 triterpenic acids for 8 weeks (Valero-Muñoz *et al.*, 2014) or oleuropein-enriched olive leaf extract
20
21 400 for 5 weeks (Romero *et al.*, 2016). The oral administration for 8 weeks of virgin olive oil (17.6
22
23
24 401 mg/kg of polyphenols) to SHR rats did not induce any change in body weight with respect to the
25
26 402 SHR control whereas the oil enriched with 750 mg/kg of polyphenols produced a slight decrease
27
28
29 403 in body weight (Vázquez *et al.*, 2019). The oral administration for 90 days of a hydrolysed aqueous
30
31 404 olive pulp extract to Sprague Dawley rats at 1.0 or 1.5 g/kg did not induce any effect on body
32
33
34 405 weight, except for the dose of 2.0 g/kg that elicited a small decrease in male and female rats
35
36 406 (Christian *et al.* 2004). In another study, Poudyal, Campbell, & Brown, (2010) observed that food
37
38 407 intake in rats fed with control diet and high carbohydrate high-fat diet were not affected by the
39
40
41 408 supplementation with 3% of olive leaf extract.

42
43
44 409 In conclusion, our study demonstrates in a rat model of hypertension, that the daily intake of table
45
46 410 olives shows the ability to counteract high blood pressure in hypertensive rats without gain of body
47
48
49 411 weight of the animals. The results shed light on the properties of table olives which have been
50
51 412 disregarded despite the well-known healthy effects of the Mediterranean diet and virgin olive oil.
52
53
54 413 The chemical profile of table olives indicated a similar fatty acid composition as olive oil, but
55
56 414 interesting differences at the level of minor components. Thus, the proportion of pentacyclic
57
58 415 triterpenes and polyphenols in table olives is higher than in olive oil, highlighting the elevated
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

416 content of maslinic and oleanolic acids to which antihypertensive effects have been attributed. Then
417 the rational intake of table olives can ameliorate human health and, in particular, could be
418 considered as a useful tool in the protection against cardiovascular disease as proposed by olive
419 oil. Therefore, the present results provide new insights not only about the positive effect of table
420 olives on BP and body weight but also establish the basis for considering table olives a valuable
421 functional food with beneficial activities on cardiovascular health.

CRedit authorship contribution statement

423 **Talia Franco-Ávila:** Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft,
424 Writing - review & editing, Visualization. **Rocío Moreno-González:** Formal analysis,
425 Investigation, Data curation. **M. Emília Juan:** Methodology, Validation, Formal analysis,
426 Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization,
427 Supervision. **Joana M. Planas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis,
428 Data curation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization,
429 Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

431 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships
432 that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Ethical statement

434 The animal studies strictly adhered to the European Community Guidelines for the care and
435 management of laboratory animals. The experimental procedure was approved by the Ethic

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

436 Committee of Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona (Ref. 105/17) and by the
437 Generalitat de Catalunya (Ref. 9468).

438 **Acknowledgements**

439 This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-41188) and
440 Generalitat de Catalunya (2014SGR1221 and 2017SGR945). TF-A. was a recipient of a fellowship
441 of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (México).

442 The authors thank Dr. Juan Carlos Laguna Egea for provide the equipment to measure the blood
443 pressure, Dr. Antoni Diez-Noguera for offer de sound-proof room, Drs. Isidre Casals, Alberto
444 Adeva and Olga Jáuregui from CCiTUB for technical assistance and Dr. Rocío Moreno-González
445 for the experimental support.

1
2
3
4 447 **REFERENCES**
5
6

- 7 448 (1) Boskou, D. (2017). Table olives: a vehicle for the delivery of bioactive compounds. *Journal*
8
9 449 *of Experimental Food Chemistry*, 3, 123-129. <https://doi.org/10.4172/2472-0542.1000123>.
10
11
12 450 (2) Christian, M. S., Sharper, V.A., Hoberman, A. M., Seng, J. E., Fu, L., Covell, D., Diener,
13
14 451 R. M., Bitler, C. M., & Crea, R. (2004). The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive
15
16 452 pulp extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 27(4), 309-330. [https://doi.org/10.1081/dct-](https://doi.org/10.1081/dct-200039714)
17
18
19 453 [200039714](https://doi.org/10.1081/dct-200039714).
20
21
22 454 (3) De Pergola, G., & D'Alessandro, A. (2018). Influence of Mediterranean diet on blood
23
24 455 pressure. *Nutrients*, 10(11), Article 1700. <https://doi.org/10.3390/nu10111700>.
25
26
27 456 (4) Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia,
28
29 457 E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L.,
30
31 458 Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., Hernán,
32
33
34 459 M. A., & Martínez-González, M. A. (2018). PREDIMED Study Investigators. Primary
35
36 460 prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-
37
38
39 461 virgin olive oil or nuts. *The New England Journal of Medicine*, 378(25), Article e34.
40
41 462 <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>.
42
43
44 463 (5) Etehad, D., Emdin, C. A., Kiran, A., Anderson, S. G., Callender, T., Emberson, J.,
45
46 464 Chalmers, J., Rodgers, A., & Rahimi, K. (2016). Blood pressure lowering for prevention of
47
48
49 465 cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*,
50
51 466 387(10022), 957-967. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01225-8).
52
53
54 467 (6) European Commission, (2012). Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May
55
56 468 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring
57
58 469 to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Official Journal*
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of the European Union, L136, 1-40. Retrieved from https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg432_2012.pdf. Accessed August 3rd, 2020.

(7) European Medicines Agency (EMA), (2011). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Guideline on Bioanalytical Method Validation*. London. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Accessed August 3rd, 2020.

(8) Islam, F. M. A., Lambert, E. A., Islam, S. M. S., Islam, M. A., Biswas, D., McDonald, R., Maddison, R., Thompson, B., & Lambert, G. W. (2021). Lowering blood pressure by changing lifestyle through a motivational education program: a cluster randomized controlled trial study protocol. *Trials*, 22(1), Article 438. <http://doi.org/10.1186/s13063-021-05379-2>.

(9) Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods*, 9(8), Article 1014. <http://doi.org/10.3390/foods9081014>.

(10) Johnson, P. R., & Hirsch, J. (1972). Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research*, 13(1), 2-11

(11) Kundisová, I., Juan, M. E., & Planas, J. M. (2020). Simultaneous determination of phenolic compounds in plasma by LC-ESI-MS/MS and their bioavailability after the ingestion of table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(37), 10213-10222. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04036>.

(12) Lerman, L. O., Kurtz, T. W., Touyz, R. M., Ellison, D. H., Chade, A. R., Crowley, S. D., Mattson, D. L., Mullins, J. J., Osborn, J., Eirin, A., Reckelhoff, J. F., Iadecola, C., & Coffman, T. M. (2019). Animal models of hypertension: a scientific statement from the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

American Heart Association. *Hypertension*, 73(6), e87-e120.
<http://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090>.

(13) Lin, H. Y., Lee, Y. T., Chan, Y. W., & Tse, G. (2016). Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. *Biomedical Reports*, 5(6), 653-659.
<http://doi.org/10.3892/br.2016.784>.

(14) Maris, M. E., Melchert, R. B., Joseph, J., & Kennedy, R. H. (2005). Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 32(1-2), 35-39.
<http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04156.x>.

(15) Moreno-González, R., Juan, M. E., & Planas, J. M. (2020). Profiling of pentacyclic triterpenes and polyphenols by LC-MS in Arbequina and Empeltre table olives. *LWT- Food Science and Technology*, 126, 109310. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109310>.

(16) Ozemek, C., Laddu, D. R., Arena, R., & Lavie, C. J. (2018). The role of diet for prevention and management of hypertension. *Current Opinion in Cardiology*, 33(4), 388-393.
<http://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000532>.

(17) Poudyal, H., Campbell, F., & Brown, L. (2010). Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *Journal of Nutrition*, 140(5), 946-53. <http://doi.org/10.3945/jn.109.117812>.

(18) Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal*, 22(3), 659-661. <http://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>.

(19) Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. (2020). Table olives and health: a review. *Journal of Nutritional Sciences*, 9, Article e57. <http://doi.org/10.1017/jns.2020.50>.

(20) Romero, M., Toral, M., Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Galindo, P., Sánchez, M., Olivares, M., Gálvez, J., & Duarte, J. (2016). Antihypertensive effects of oleuropein-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food & Function*, 7(1), 584-593. <http://doi.org/10.1039/c5fo01101a>.

(21) Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2013). Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12173-12182. <http://doi.org/10.1021/jf403154e>.

(22) Serra-Majem, L., Tomaino, L., Dernini, S., Berry, E. M., Lairon, D., Ngo de la Cruz, J., Bach-Faig, A., Donini, L. M., Medina, F. X., Belahsen, R., Piscopo, S., Capone, R., Aranceta-Bartrina, J., La Vecchia, C., & Trichopoulou, A. (2020). Updating the Mediterranean diet pyramid towards sustainability: focus on environmental concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23), Article 8758. <http://doi.org/10.3390/ijerph17238758>.

(23) Terés, S., Barceló-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J. E., & Escribá, P. V. (2008). Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(37), 13811-13816. <http://doi.org/10.1073/pnas.0807500105>.

(24) Valero-Muñoz, M., Martín-Fernández, B., Ballesteros, S., de la Fuente, E., Quintela, J. C., Lahera, V., & de las Heras, N. (2014). Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: mechanisms involved. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(2), 376-383. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201300256>.

(25) Vazquez, A., Sanchez-Rodriguez, E., Vargas, F., Montoro-Molina, S., Romero, M., Espejo-Calvo, J. A., Vilchez, P., Jaramillo, S., Olmo-García, L., Carrasco-Pancorbo, A., de la Torre, R., Fito, M., Covas, M. I., Martínez de Victoria, E., & Mesa, M. D. (2019).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

542 Cardioprotective effect of a virgin olive oil enriched with bioactive compounds in
543 spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*, 11(8), Article 1728.
544 <http://doi.org/10.3390/nu11081728>.

(26) Zhou, B., Perel, P., Mensah, G. A., & Ezzati, M. (2021). Global epidemiology, health
burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nature
Reviews. Cardiology.*, 28, 1-18. <http://doi.org/10.1038/s41569-021-00559-8>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure captions

Figure 1. Blood pressure (BP) in normotensive (WKY) and hypertensive rats (SHR) after the single oral administration of Arbequina table olives at a dose of 3.85 g destoned olives/kg or water. Graph depicts the time course over 24 hours of the systolic, diastolic, and mean BP in WKY (A and C) and SHR (B and C). Values are presented as means \pm SEM (n = 6-8) and were analysed by two-way ANOVA followed by Fischer multiple comparison test. Different from control rats, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. Different from time 0 hours, δ , $p < 0.05$, $\delta\delta$, $p < 0.01$, $\delta\delta\delta$, $p < 0.001$.

Figure 2. Body weight in normotensive (WKY) and hypertensive (SHR) rats. Graph represents the time course of the WKY (squares) and SHR (circles) rats treated with Arbequina table olives at a dose of 3.85 g destoned olives/kg (black) or water (white). Values are presented as means \pm SEM (n = 6-8) in the WKY rats and means \pm SEM in the SHR animals. Body weight was analysed by two-way ANOVA followed by Fischer multiple comparison test, $p > 0.05$ control versus treated animals.

Figure 3. Blood pressure (BP) in normotensive (WKY) and hypertensive rats (SHR) after the daily oral administration of Arbequina table olives at a dose of 3.85 g destoned olives/kg or water. Graph represents the time course over 7 weeks of the systolic, diastolic, and mean BP in WKY (A and C) and SHR (B and C). Values are presented as means \pm SEM (n = 6-8) and were analysed by two-way ANOVA followed by Fischer multiple comparison test, $p < 0.05$. Different from control rats, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$. Different from day 1, δ , $p < 0.05$.

Table 1. Relative organ weight and fat depots of WKY and SHR rats after the oral administration of Arbequina table olives at a dose of 3.85 g destoned olives/kg for 49 days compared with control animals.

Organ (mg/g of body weight)	WKY control (n = 5)	WKY olives (n = 8)	SHR control (n = 7)	SHR olives (n = 8)
Kidneys	5.79 ± 0.06 ^a	5.51 ± 0.09 ^a	5.53 ± 0.08 ^a	5.70 ± 0.14 ^a
Liver	27.21 ± 0.46 ^a	26.19 ± 0.38 ^a	33.87 ± 0.38 ^b	32.94 ± 1.07 ^b
Heart	3.69 ± 0.12 ^a	3.63 ± 0.13 ^a	4.65 ± 0.03 ^b	4.70 ± 0.25 ^b
Spleen	1.71 ± 0.02 ^a	1.67 ± 0.02 ^a	1.95 ± 0.04 ^b	1.91 ± 0.04 ^b
Lungs	3.57 ± 0.04 ^a	3.65 ± 0.14 ^a	3.78 ± 0.17 ^a	3.93 ± 0.19 ^a
Omental depot	3.70 ± 0.28 ^a	4.08 ± 0.18 ^a	4.39 ± 0.25 ^a	4.30 ± 0.27 ^a
Left retroperitoneal pad	8.52 ± 0.51 ^a	9.06 ± 0.53 ^a	8.25 ± 0.21 ^a	7.94 ± 0.53 ^a
Left epididymal pad	4.86 ± 0.54 ^a	5.49 ± 0.39 ^a	3.34 ± 0.15 ^b	3.60 ± 0.14 ^b

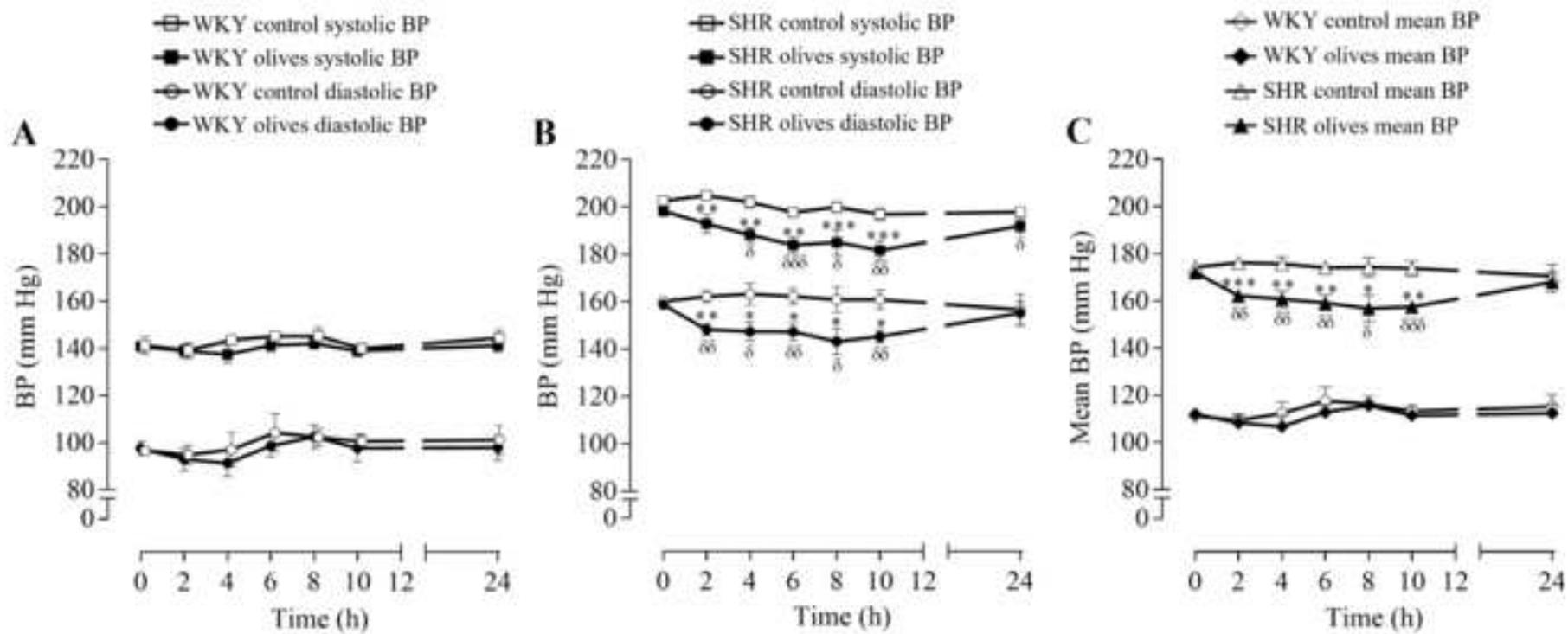
Results are expressed as means ± SEM and were analysed by two-way ANOVA followed by Fischer multiple comparison test. No differences between control and olives group were found within each strain ($p>0.05$). Means without a common letter differ ($p<0.01$).

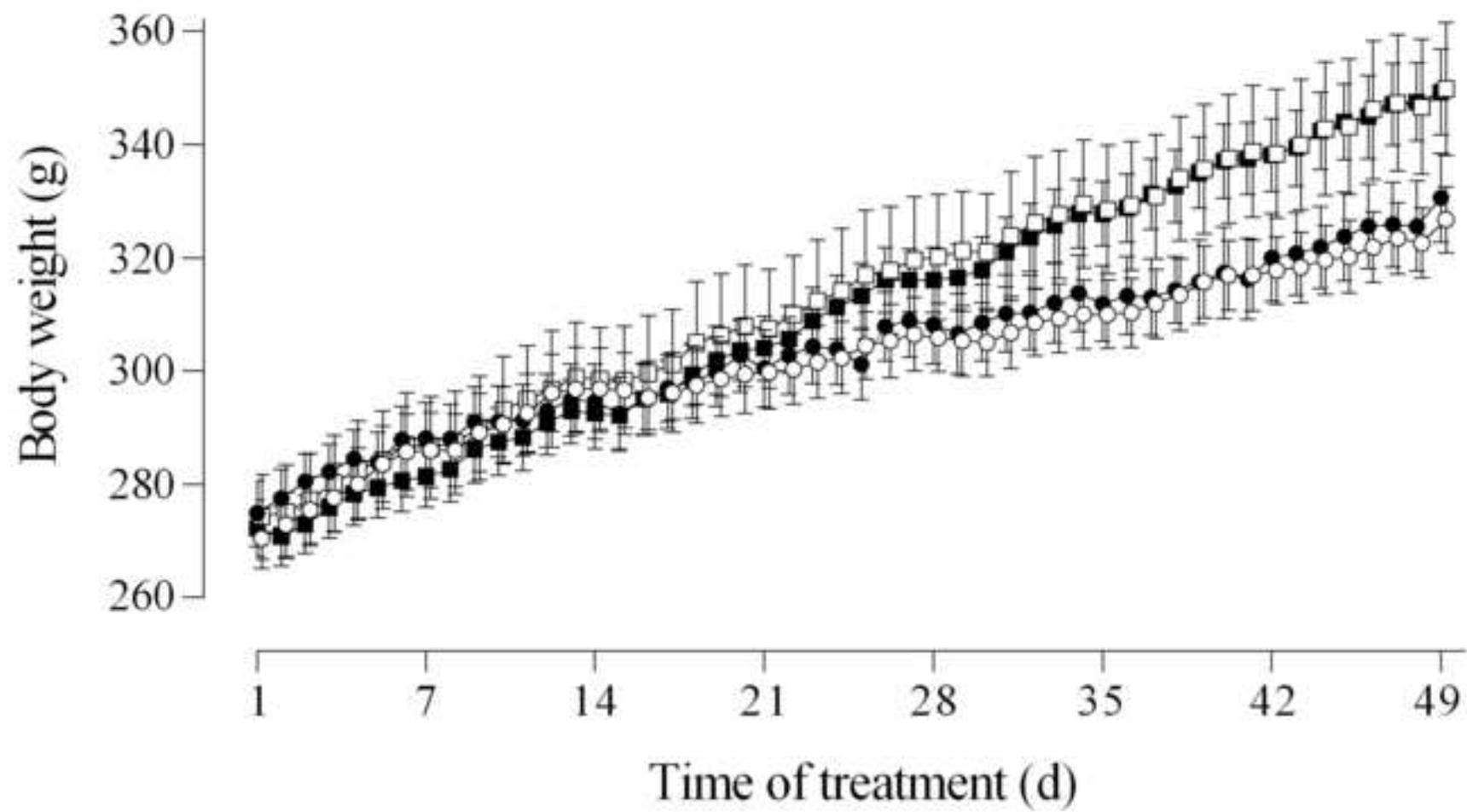
Table 2. Determination of pentacyclic triterpenes by LC-APCI-MS and polyphenols by LC-ESI-MS/MS. Concentrations in animal feed, Arbequina table olives, dose administered to the animals in the WKY olives and SHR olives groups and the plasmatic concentrations obtained 15 to 17 h after the oral administration of 3.85 g of destoned olives/kg of body weight for 49 days.

Compound		Animal feed	Arbequina table olives		Plasma after treatment	
		mg/kg	mg/kg olive	µg in olives	WKY olives (nM)	SHR olives (nM)
<i>Pentacyclic triterpenes</i>						
Triterpenic acids	Maslinic acid	ND	2341 ± 82.2	2.708	3.13 ± 0.85	3.51 ± 1.10
	Oleanolic acid	ND	862 ± 44.0	0.997	1.08 ± 0.19	1.34 ± 0.40
	Ursolic acid	ND	<LOD	--	<LOD	<LOD
Triterpenic alcohols	Erythrodiol	ND	10.4 ± 0.1	0.012	<LOD	<LOD
	Uvaol	ND	<LOD	--	<LOD	<LOD
<i>Polyphenols</i>						
Phenolic alcohols	Hydroxytyrosol	ND	475 ± 11.8	0.549	0.50 ± 0.20	0.48 ± 0.14
	Hydroxytyrosol acetate	ND	26.9 ± 0.7	0.031	<LOD	<LOD
	Tyrosol	ND	23.1 ± 0.6	0.027	<LOD	<LOD
	Salidroside	ND	17.4 ± 1.0	0.020	<LOD	<LOD
	Catechol	ND	<LOD	--	<LOD	<LOD
Phenolic acids	Vanillic acid	0.54 ± 0.004	3.56 ± 0.1	0.004	<LOQ	<LOQ
	<i>p</i> -Coumaric acid	1.69 ± 0.02	5.65 ± 0.1	0.007	<LOQ	<LOQ
	Caffeic acid	0.26 ± 0.001	4.64 ± 0.1	0.005	<LOD	<LOD
	Verbascoside	ND	334 ± 30.8	0.387	<LOQ	<LOQ
Flavonoids	Luteolin	ND	89.6 ± 3.0	0.104	0.42 ± 0.02	0.12 ± 0.02
	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	ND	11.1 ± 1.7	0.013	<LOQ	<LOQ
	Quercetin	ND	6.49 ± 0.2	0.008	<LOD	<LOD
	Rutin	ND	26.0 ± 3.1	0.030	<LOQ	<LOQ
	Apigenin	ND	4.52 ± 0.2	0.005	<LOQ	<LOQ
Secoiridoids	Oleuropein	ND	12.6 ± 0.2	0.015	<LOQ	<LOQ
Lignans	(+)-Pinoresinol	ND	3.08 ± 0.2	0.004	<LOD	<LOD

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Results are expressed as means \pm SEM. ND, not detected, LOD, limit of detection, LOQ, limit of quantification.





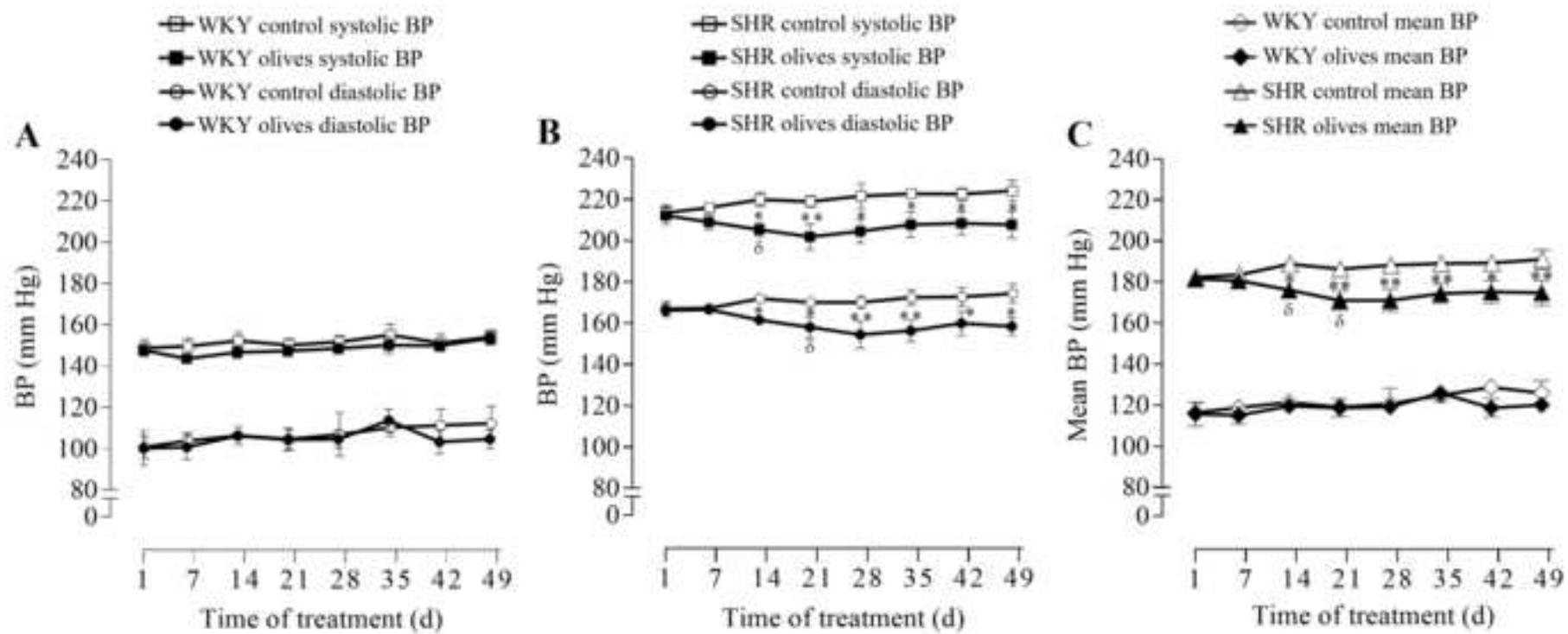
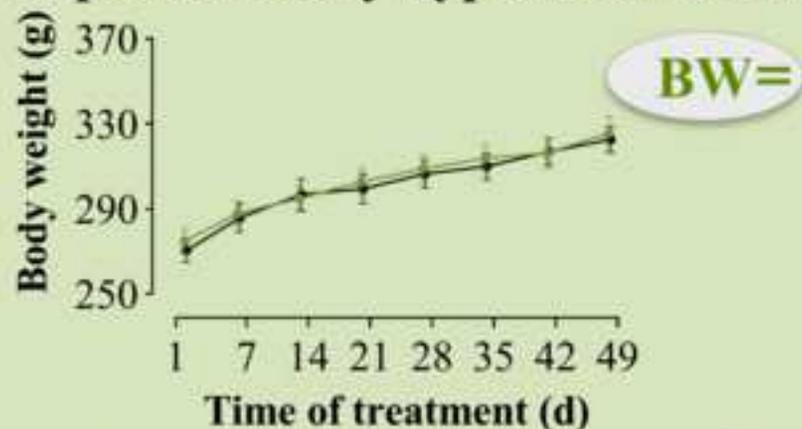
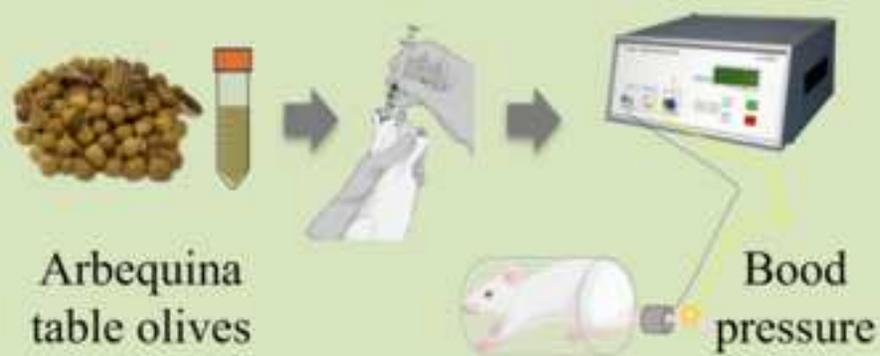
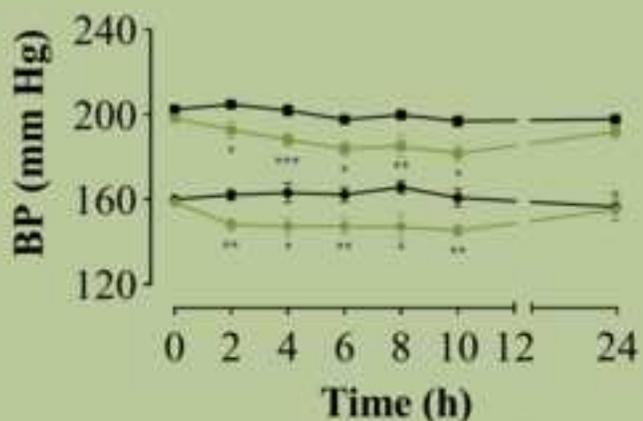


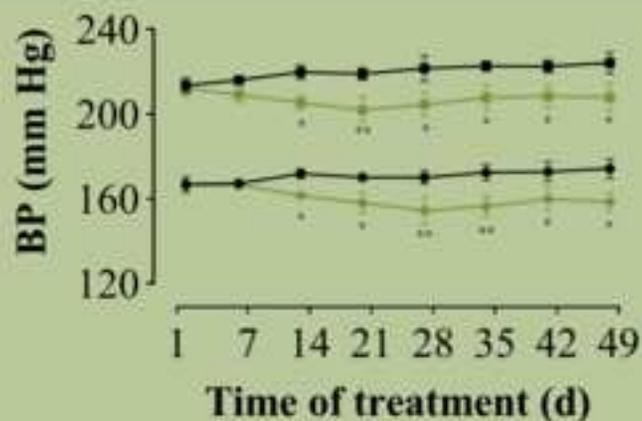
Table olive elicits antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats



ACUTE ASSAY



— Control group — Olives group



■ Systolic BP ● Diastolic BP

CHRONIC ASSAY

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Ethical statement

The animal studies strictly adhered to the European Community Guidelines for the care and management of laboratory animals. The experimental procedure was approved by the Ethic Committee of Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona (Ref. 105/17) and by the Generalitat de Catalunya (Ref. 9468).

CRedit authorship contribution statement

Talia Franco-Ávila: Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Rocío Moreno-González:** Formal analysis, Investigation, Data curation. **M. Emília Juan:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision. **Joana M. Planas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.