

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVO DE DIFERENTES COMPUESTOS FENÓLICOS
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN "IN VITRO"
Cecília González Gómez-Navarro
ISBN:978-84-692-9051-4/DL: T-2058-2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVO DE DIFERENTES COMPUESTOS FENÓLICOS
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN "IN VITRO"
Cecília González Gómez-Navarro
ISBN:978-84-692-9051-4/DL: T-2058-2009

Portada: "Los olivos" de Van Gogh

Efecto antioxidante y antihipertensivo de
diferentes compuestos fenólicos del Aceite de
Oliva Virgen "*in vitro*".

Cecilia González Gómez-Navarro
Tesis Doctoral
Universitat Rovira i Virgili
Reus 2009

Gracias a la vida que me ha dado tanto,
me ha dado la risa y me ha dado el llanto

...

Gracias a la vida que me ha dado tanto

Violeta Parra

ÍNDICE

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	17
DIETA MEDITERRÁNEA	17
ACEITE DE OLIVA	19
Composición del Aceite de Oliva Virgen	21
Fracción oleosa	21
Fracción no oleosa:.....	23
Clasificación de los diferentes tipos de aceite de oliva .	26
Compuestos fenólicos del aceite de oliva	27
Familia Oleaceae	27
Distribución de los compuestos fenólicos en la planta .	30
Química de los compuestos fenólicos.....	35
Compuestos fenólicos y sabor en el aceite de oliva.....	50
Biodisponibilidad en humanos.	51
Oxidación.....	53
Estrés oxidativo	53
Evidencia in vivo de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos del aceite de oliva	55
Enzima Conversora de Angiotensina.....	60
Efecto del aceite de oliva en la Hipertensión	62
Péptidos lácteos	63
Características de los péptidos	67
Unión ECA-péptido.....	68
Estudios con péptidos lácteos.....	69
Tránsito intestinal versus DIANA en humanos.....	75
Péptidos de soja versus isoflavonas	80

Péptidos de huevo	84
Actividad de procianidinas, flavonoides y compuestos fenólicos de la dieta sobre la ECA	88
Plantas de uso tradicional antihipertensivo	91
Efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la presión arterial.....	96
HIPÓTESIS	105
OBJETIVOS	105
MATERIAL Y MÉTODOS	109
FORMACIÓN DE DIENOS CONJUGADOS	109
Fundamento	109
Reactivos	114
Soluciones de trabajo.....	114
Equipo y material	115
Preparación y conservación de la LDL.....	116
Compuestos Fenólicos.....	116
Procedimiento: Oxidación de la LDL, valorado por la Formación de Dienos Conjugados	124
ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE LA ECA	127
Fundamento	127
Reactivos	129
Soluciones de trabajo.....	130
Equipo y material	131
Preparación de la ECA	131
Compuestos fenólicos.....	131
Procedimiento: Actividad IECA	132
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	134

RESULTADOS.....	137
Curvas dosis efecto de compuestos fenólicos individuales en la oxidación de la LDL inducida por Cu ²⁺	137
Efecto de los compuestos fenólicos individuales sobre la <i>Lag Phase</i> en la oxidación de la LDL inducida por Cu ²⁺ a concentración 0.5 µM.	140
Efecto sinérgico de los compuestos fenólicos en el aumento de la <i>Lag Phase</i> en la oxidación de la LDL inducida por Cu ²⁺	142
Efecto inhibidor de la ECA por parte de los compuestos fenólicos.....	147
DISCUSIÓN	155
CONCLUSIONES	173
ANEXOS	175
BIBLIOGRAFÍA	185



RESUMEN

RESUMEN

El aceite de oliva virgen está compuesto por una fracción oleosa mayoritaria y otra no oleosa minoritaria, que contiene los compuestos fenólicos.

Nuestra hipótesis es que un aceite de oliva enriquecido en compuestos fenólicos elegidos por su actividad protectora de la oxidación y de la presión arterial podría tener efectos más beneficiosos que los obtenidos con el consumo del aceite de oliva virgen en su estado natural. El poder antioxidante puede estar involucrado en la reducción de la presión arterial, por lo que se han planteado 2 objetivos:

1. El primer objetivo es valorar la capacidad antioxidante de 19 compuestos fenólicos del aceite de oliva y, a partir de los que poseen mayor poder antioxidante, se ha estudiado esta misma capacidad para las diferentes combinaciones de compuestos y su posible efecto sinérgico *in vitro*. El poder antioxidante se ha analizado por la *Lag Phase* (valorada en minutos) en la formación de dienos conjugados de la LDL inducida por cobre. Así, a más minutos de *Lag Phase*, mayor resistencia y por tanto, menor susceptibilidad a la oxidación. Se ha mejorado el método de análisis, que ha permitido reducir el volumen final de la muestra y el análisis de un mayor número de muestras en cada ensayo. Los 5 compuestos fenólicos detectados con mayor actividad antioxidante son, en orden decreciente: **luteolina**, **rutina**,

hidroxitirosol, oleuropeína y 3,4-DHPEA-EDA. La mezcla de los 5 compuestos con mayor actividad antioxidante incrementa en 1.8 veces la suma de la *Lag Phase* de cada uno de los compuestos fenólicos individualmente ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren la actuación sinérgica de dichos compuestos en el aumento de la susceptibilidad de la LDL a la oxidación inducida por Cu^{2+} *in vitro*.

2. El segundo objetivo es analizar la capacidad de inhibir la Enzima Conversora de Angiotensina, en un ensayo fluorimétrico *in vitro*. De los compuestos fenólicos estudiados, luteolina, 3,4-DHPEA-EDA, pinosresinol, *p*-HPEA-EDA, ácido ferúlico, ácido cumárico e hidroxitirosol, presentan *in vitro* actividad inhibidora de la Enzima Conversora de Angiotensina. El ***p*-HPEA-EDA** y el **pinosresinol** ejercieron un efecto inhibitorio con un $\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{M}$, y la **luteolina** y el **3,4-DHPEA-EDA** con valores de IC_{50} (media \pm SD) de $52.3 \pm 4.7 \mu\text{M}$ y $57.5 \pm 9.0 \mu\text{M}$, respectivamente. De modo que por primera vez se ha relacionado la capacidad antioxidante con la capacidad de inhibición de la Enzima Conversora de Angiotensina, sugiriendo su acción en esta ruta metabólica para reducir la presión arterial.

Estos resultados respaldan la hipótesis de que un aceite enriquecido en compuestos fenólicos elegidos por su actividad

protectora de la oxidación puede reducir la presión arterial y obtener más efectos beneficiosos que con el consumo del aceite de oliva virgen en su estado natural.

El presente estudio se encuadra en el marco del proyecto colaborativo: *Aceite de oliva virgen enriquecido en compuestos fenólicos. Obtención de fenoles purificados, evaluación de su potencial antioxidante y desarrollo de un prototipo de aceite de oliva enriquecido de la Universitat Rovira i Virgili, (AGL2005-07881-C02-02)* con la Universitat de Lleida.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

DIETA MEDITERRÁNEA

La definición más amplia de la dieta mediterránea se refiere no sólo al tipo de alimentación sino, a un estilo de vida particular de la cuenca mediterránea. En esta región, se estima el placer de comer y compartir los alimentos con otros, dedicar tiempo a saborear los alimentos y descansar tras la comida para ayudar a la digestión de los mismos (de la Torre-Boronat, 1999).

La dieta mediterránea se compone fundamentalmente de los siguientes elementos (Willett et al., 1995):

- Cereales: trigo, polenta, pasta, cous-cous y arroz constituyen la base de la mayoría de las comidas, proporcionando los carbohidratos complejos de la dieta.
- Frutas y verduras: de temporada y cocinadas ligeramente. El postre de las comidas tiende a ser fruta en toda la cuenca mediterránea.
- Frutos secos y legumbres: garbanzos, lentejas, judías blancas, piñones, castañas, nueces y almendras son muy corrientes en la dieta y proporcionan fibra, antioxidantes y fitoestrógenos.
- Productos lácteos: queso, yogur y otros proporcionan proteínas y aminoácidos esenciales.
- Pescado: cocinado ligeramente es la fuente principal de proteínas en el área mediterránea, incluso por delante de

los huevos, carne de ave y carne roja. Alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y especialmente en ácidos grasos omega-3.

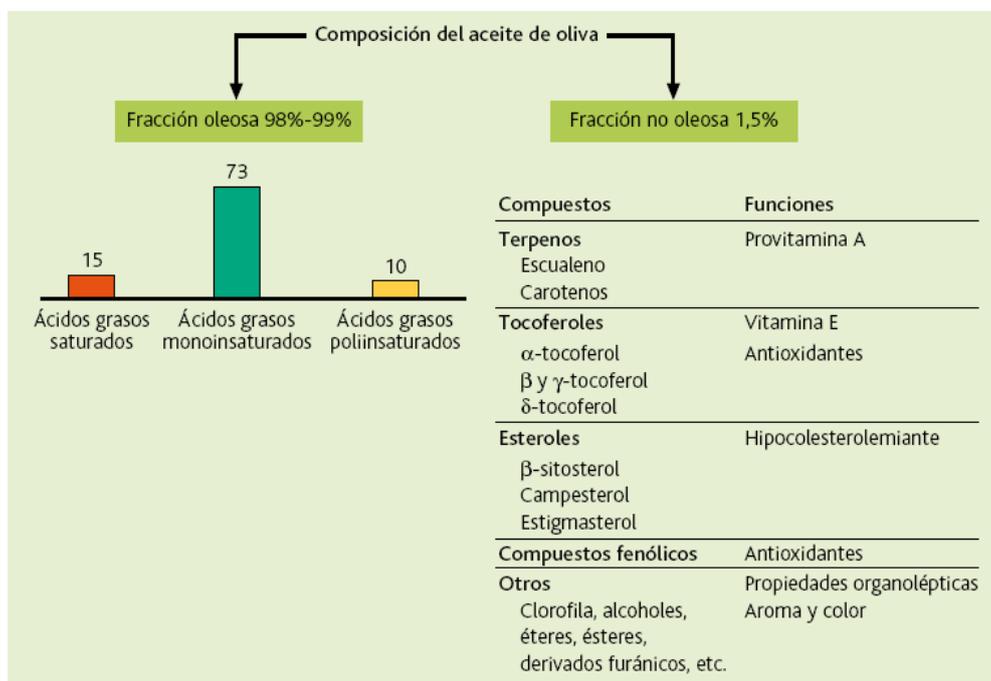
- Carne: consumo moderado pero suficiente.
- Bollería: muy bajo consumo.
- Aderezos: uso abundante de ajo y hierbas aromáticas como orégano, romero, tomillo, salvia, menta, cilantro, comino, perejil, laurel e hinojo. Proporcionan compuestos fenólicos antioxidantes.
- Vino y ejercicio: consumo moderado de vino (un vaso durante las comidas) y ejercicio físico regular.
- Aceite de oliva virgen (AOV) como la grasa visible principal y más típica en la dieta mediterránea.

Una población con mayor seguimiento de este tipo de alimentación se acompaña de una mayor longevidad y una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, principal causa de mortalidad y morbilidad en el mundo occidental (Trichopoulou et al., 2005; Trichopoulou et al., 2003).

ACEITE DE OLIVA

Las propiedades saludables del aceite han sido atribuidas al elevado contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs, Monounsaturated fatty acid), fundamentalmente ácido oleico. Sin embargo, en la actualidad no existe consenso sobre los efectos de MUFA sobre los lípidos y lipoproteínas circulantes: los efectos de la ingesta elevada de MUFA pueden ser indirectos y debidos al reemplazo asociado de ácidos grasos saturados (Hegsted et al., 1993). Es importante resaltar que el ácido oleico es uno de los ácidos grasos predominantes en la grasa animal consumida más abundantemente como el pollo y cerdo, por lo tanto el consumo de ácido oleico en los países mediterráneos es sólo ligeramente superior al de otras dietas occidentales, como la norteamericana (Dougherty et al., 1987). Algunos aceites derivados de semillas que han sido seleccionadas genéticamente, como el de girasol, soja o colza son ricos en MUFA pero no contienen compuestos fenólicos. Por lo tanto, es poco probable que el ácido oleico sea el único compuesto responsable de los efectos saludables de la ingesta de aceite de oliva (Pérez-Jiménez et al., 2004). En cualquier caso, los efectos saludables atribuidos al ácido oleico como son la mejora de la función endotelial y la baja susceptibilidad a la oxidación de la LDL circulante, son considerables (Covas, 2007). Sin embargo, lo que verdaderamente diferencia el aceite de oliva de los otros aceites vegetales es el contenido de compuestos fenólicos.

Figura 1: Composición del Aceite de Oliva Virgen.



(Mataix, 2004)

Las olivas son ricas en compuestos fenólicos. En los últimos años se han ido comprobando las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, demostrando que el hidroxitirosol y la oleuropeína son potentes captadores de anión superóxido y otras especies reactivas posiblemente implicados en el inicio de la enfermedad coronaria cardiaca y la mutagénesis. Además, el hidroxitirosol y la oleuropeína también son capaces de modular procesos enzimáticos, algunos de los cuales pueden ser relevantes para la enfermedad coronaria (Covas et al., 2006c; de la Puerta et al.,

1999; Kohyama et al., 1997; Petroni et al., 1995). Por ejemplo, el hidroxitirosol ha demostrado ser capaz de inhibir la agregación de plaquetas, sugiriendo un potencial antitrombótico (Togna et al., 2003).

La absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos del aceite de oliva ha sido estudiada y documentada, sin embargo no existen suficientes estudios sobre su potencial antioxidante y su actividad biológica *in vivo*.

Composición del Aceite de Oliva Virgen

El AOV está compuesto por una fracción oleosa de compuestos mayoritarios en un 96-98% y una fracción no oleosa de compuestos minoritarios en un 1,5% ver **Figura 1** (Mataix, 2004).

La siguiente descripción está basada en la publicación de Alarcón de la Lastra (Alarcon de la Lastra et al., 2001).

Fracción oleosa: la parte más importante de los compuestos mayoritarios está constituida por triglicéridos. El resto está principalmente compuesto por ácidos grasos libres y otros componentes menores como mono y diacilgliceroles, fosfatidas, ceras y ésteres de esteroides.

Ácidos grasos: el ácido oleico (18:1n-9), MUFA, es el ácido graso mayoritario, constituye entre el 56%-84% del total de ácidos grasos.

Otros ácidos grasos minoritarios son: ácido palmítico y esteárico (saturados) y una pequeña cantidad de ácidos linoleico y α -linolénico (PUFA). La composición de ácidos grasos depende del origen geográfico del aceite de oliva, ya que le afectan la latitud, clima, variedad genética y grado de madurez de la oliva. Por ejemplo, la concentración de ácido oleico disminuye a medida que se avanza hacia el sur. La proporción de ácidos grasos insaturados/saturados y la de oleico/linoleico aumenta con la latitud. Esto se debe a que se consigue mayor madurez de la oliva en el mismo tiempo cuanto más al sur nos desplazamos.

También se han estudiado las proporciones de ácidos grasos por cada variedad de olivo.

Triacilgliceroles o trigliceroles: la mayor parte de los ácidos grasos de los aceites comestibles se presentan como triacilgliceroles. La composición de los triacilgliceroles del aceite de oliva sigue un patrón en el que los ácidos grasos en la posición 2 de la molécula de glicerol son insaturados, generalmente ácido oleico.

Fracción no oleosa: está formada por compuestos no volátiles que se obtienen tras la reacción de saponificación del aceite con un hidróxido alcalino y posterior extracción con un disolvente. Contiene lípidos de origen natural como esteroides, alcoholes alifáticos superiores, pigmentos e hidrocarburos y partículas orgánicas que no son volátiles a 103°C. También se incluyen en esta fracción los compuestos fenólicos polares, aunque no son obtenidos por el mismo método.

Hidrocarburos: la fracción no oleosa del aceite de oliva constituye una parte importante de los hidrocarburos, entre el 30-50% del total. Incluye el escualeno y los carotenoides.

Escualeno: es un precursor bioquímico de los esteroides y un importante hidrocarburo del AOV y refinado. El aceite de oliva contiene la mayor cantidad de escualeno entre todos los aceites vegetales.

Carotenoides: la fracción de carotenoides está constituida por luteína (0,5-1mg/100g de aceite), β -caroteno (5-15%) y varios xantanos. Estos compuestos son pigmentos.

Clorofilas: la fracción clorofílica está compuesta por clorofilas a y b y sus derivados libres de magnesio, feofitinas a y b. En el aceite de oliva natural, esta fracción se encuentra en concentraciones entre 1-20ppm y los componentes mayoritarios son feofitina a (20-40%) y clorofila a (4-7%) El contenido de clorofilas disminuye considerablemente en aceites refinados.

Tocoferoles: el contenido total de tocoferoles en el aceite de oliva depende de la variedad y varía entre 5-330 ppm. α -tocoferol es el principal (52-87%), β -tocoferol (15-20%) y γ -tocoferol (7-23%). El contenido es de 100-300 ppm en los aceites de oliva de elevada calidad. El contenido de tocoferoles disminuye considerablemente en aceites refinados. Son excelentes agentes antioxidantes naturales y confieren estabilidad al AOV.

Alcoholes alifáticos: alcoholes alifáticos saturados con número par de átomos de carbono (C18-C28) y cadenas simples. Los principales presentes en aceite de oliva son: hexacosanol, octacosanol y tetracosanol. También se encuentran trazas de pentacosanol y heptacosanol. Varían entre 10-70 mg/100g.

Esteroles: el aceite de oliva contiene esteroides en una concentración que varía entre 100-220 mg/100g de aceite. Los principales esteroides son β -sitosterol, α -5-avenasterol y campesterol. Stigmasterol, α -5,24-stigmastadienol, α -7-stigmasterol y α -7-avenasterol se encuentran en menores cantidades. También se encuentran dialcoholes, como eritrodil y uvaol en concentraciones entre 1-20 mg/100 g de aceite.

Compuestos fenólicos: constituyen parte de la fracción polar del AOV y se extraen normalmente con mezclas de metanol y agua. Esta fracción es muy compleja y muchos de sus componentes están aún por identificar. Entre los compuestos fenólicos, encontramos: *tirosol* (4-hidroxifeniletanol), *hidroxitirosol* (3,4-dihidroxifeniletanol), *oleuropeína*, *ácido cafeico*, *ácido vainílico*, *ácido siríngico*, *ácido p-cumárico*, *ácido o-cumárico*, *ácido protocatecuico*, *ácido hidroxibenzoico*, *ácido 4-hidroxibenzoico*, *ácido 4-hidroxifenilacético*, *ácido 3,4-dihidroxifenilacético* y *3,4-DHPEA-EDA* (éster dialdehído del ácido elenólico e hidroxitirosol).

La concentración absoluta de fenoles en el AOV es el resultado de una compleja interacción entre varios factores, incluyendo el cultivar, el grado de madurez de la oliva, clima y otros factores tecnológicos como los procesos de extracción. Generalmente disminuye con la maduración de las olivas, aunque hay algunas excepciones. Por ejemplo, las olivas de climas más cálidos, a pesar de que maduran más rápido, producen aceites más ricos en fenoles. Por lo tanto, la concentración total de fenoles (alcoholes, ácidos fenólicos y otros) varía entre 50-200 ppm. Pueden encontrarse aceites con 1000 ppm (Montedoro et al., 1992).

Estos compuestos, aunque minoritarios, confieren las propiedades organolépticas (sabor y aroma). Por lo tanto, la mayoría de los fenoles confieren un sabor amargo y penetrante al aceite. Tienen propiedades antioxidantes que

contribuyen a la prevención de ranciedad, dado que un elevado contenido en compuestos fenólicos está asociado con una elevada resistencia a la oxidación (Montedoro et al., 1992).

En contraste con otros aceites, el AOV producido a partir de olivas de buena calidad, se consume sin refinar. Por lo tanto, los aceites de oliva contienen compuestos fenólicos que son normalmente eliminados en el proceso de refinado de otros aceites.

Compuestos volátiles: en concentraciones extremadamente bajas, confieren aroma al aceite de oliva. La composición química varía en función de la variedad del olivo, condiciones climáticas y calidad del aceite.

Clasificación de los diferentes tipos de aceite de oliva

Según el proceso de extracción y purificación posterior al que sea sometido el aceite, se distinguen diferentes categorías (ver **Tabla 1**):

- aceite de oliva **virgen extra**
- aceite de oliva **virgen**
- aceite de oliva lampante
- aceite de oliva refinado
- aceite de oliva (refinado + virgen)
- aceite de orujo crudo
- aceite de orujo refinado

aceite de orujo

de tal modo, que la concentración de compuestos fenólicos disminuirá con el refinado.

El aceite de oliva constituye el 4% de la producción total mundial de aceite vegetal. Se producen aproximadamente 2.000.000 toneladas/año, siendo la contribución de los países mediterráneos el 95% de la producción mundial. Gracias a la popularidad de la dieta mediterránea, el consumo y producción de aceite de oliva se está expandiendo a otros países donde no se producía tradicionalmente, como los Estados Unidos de América, Canadá, Australia, Sudamérica, Nueva Zelanda y Japón (Visioli and Galli, 2002).

Compuestos fenólicos del aceite de oliva

Familia Oleaceae

La agrupación taxonómica de los géneros de esta familia responde a similitudes morfológicas basadas en características vegetativas y reproductivas, y los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de una serie de compuestos fenólicos denominados secoiridoides (Ryan et al., 2002).

El olivo (*Olea europea* L.) árbol de fruto, pertenece al género *Olea* de la familia *Oleaceae*, la cual comprende un gran número de géneros como son *Fraxinus* (fresno), *Forsythia* (forsicia, campanita china), *Jasminum* (jazmin), *Ligustrum* (aligustre, olivareta), *Syringa* (lilas), a parte del género *Olea*

(olivo). Además, las plantas oleáceas son diversas en cuanto a su morfología, incluye árboles, arbustos y ocasionalmente trepadoras. Varias especies de esta familia nos aprovisionan de productos comerciales como alimentos, madera y productos medicinales. *Fraxinus pensilvanica* se utiliza como pantalla contra el viento en el medio oeste de Estados Unidos, otros miembros de la familia procuran hábitat y alimento para la fauna salvaje, mientras otros tienen características ornamentales; por ejemplo, *Fraxinus americana* con un color de hoja otoñal muy apreciado, mientras *Forsythia* spp. presenta un brillante color amarillo en primavera (Ryan et al., 2002).

Tabla 1: Categorías comerciales de aceite de oliva

Categoría	Acidez	Proceso de extracción	Características
Aceite de Oliva Virgen Extra	≤0,8	Únicamente procesos mecánicos (temperatura, lavado, decantación, centrifugación y filtrado,)	Mejores características organolépticas. Monovarietal o DOP denominación Origen Protegida
Aceite de Oliva Virgen	≤2	Igual que el anterior	Buenas características químicas, pero ha sufrido variación organoléptica, difiere del extra en la puntuación en el panel de catadores
Aceite de Oliva Lampante	>2	Igual que el anterior	Aroma y sabor defectuosos. El que se usaba en las lámparas de aceite que iluminaban los hogares
Aceite de Oliva Refinado	≤0,3	Refinado químico posterior	Carece de sabor y aroma. Se utiliza fundamentalmente en la composición de otros aceites. Altamente oxidable, su contenido en antioxidantes es menor. Habitual que proceda de aceite lampante que no se puede embasar por defectuoso; tras el refinado disminuye la acidez, y puede ser envasado y distribuido.
Aceite de Oliva (refinado + virgen)	≤1	Refinado químico posterior + aceite virgen	Mezcla de aceite refinado y virgen diferente del lampante. Se encuentra en el mercado a menor precio
Aceite de Orujo crudo		Con disolventes a partir del orujo	
Aceite de Orujo refinado	≤0,3	Disolventes + refinado	Obtenido por refinado del aceite de orujo crudo
Aceite de Orujo	≤1	Disolventes + refinado + aceite virgen	Mezcla de aceite de orujo refinado y aceite de oliva virgen

Acidez del aceite de oliva: contenido en ácido oleico libre, valorado en gramos de ácido por cada 100 gramos de aceite, expresado en grados. Según normativa publicada por el Boletín Oficial de la Unión Europea 2007.

Distribución de los compuestos fenólicos en la planta

Los compuestos fenólicos se encuentran en todas las partes de la planta, pero su naturaleza y concentración varía mucho en los distintos tejidos (Ryan et al., 2002). La oleuropeína es generalmente el compuesto más prominente del cultivar del olivo y puede alcanzar concentraciones muy elevadas en materia seca de hoja y de olivas jóvenes, siendo más fácil de extraer de la fracción fenólica de hojas y frutos, pero más complicado en aceite (Ryan et al., 2002).

Durante la maduración del fruto uno de los hechos más significativos es el cambio de color. Entre seis y ocho meses después de la floración del árbol, los frutos alcanzan su peso máximo, la aparición de la nueva coloración junto con los cambios fisiológicos asociados, indican el final del proceso de maduración. Durante la fase de crecimiento la oleuropeína alcanza valores muy elevados en el fruto inmaduro no obstante, su concentración disminuye con el desarrollo fisiológico, llegando a niveles mínimos cuando la oliva alcanza el color negro.

Los niveles de oleuropeína pueden llegar a cero cuando el fruto está completamente negro (Ryan et al., 2002).

Los niveles de fenoles simples como tirosol e hidroxitirosol también difieren mucho durante el crecimiento y la maduración del fruto; en este caso, su aumento se debe a la hidrólisis de compuestos de mayor peso molecular (Brenes et al., 1999; Ryan et al., 2002).

Brenes *et. al.* detectaron dos tendencias diferenciadas con la maduración del fruto. Por un lado, el ácido vainílico, vainillina, ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico permanecían prácticamente constantes, mientras que por otro, el progreso de la maduración causaba un aumento de la concentración de tirosol e hidroxitirosol en los aceites. Siendo siempre mayor la cantidad del primero que del segundo (Brenes *et al.*, 1999; Romani *et al.*, 1999).

Tabla 2: Concentración de oleuropeína e hidroxitirosol en dos variedades de olivo.

Compuesto	Maduración	
	Precoz (Ro)	Lenta (Ci)
Oleuropeína	Muy baja	Alta
Hidroxitirosol	Muy ALTA	Baja

Dos variedades de olivo que difieren en el tiempo de maduración del fruto; maduración precoz Rossellino (Ro), y tardía Ciliegino (Ci). Si la recolección de ambas variedades se produce el mismo día, el fruto muy maduro (Ro) tendrá muy alta concentración de hidroxitirosol, frente al fruto no tan maduro (Ci) que tendrá alta concentración de Oleuropeína (Romani *et al.*, 1999).

Cuando Romani y colaboradores compararon la concentración de algunos fenoles en varios aceites de oliva monovarietales, entre los que contaban con la variedad Rossellino (Ro) de maduración precoz, y la Ciliegino (Ci) de maduración tardía, vieron que el día que se cosecharon probablemente Ro presentaba mayor grado de maduración que Ci, por tanto, la

oleuropeína había sido hidrolizada a hidroxitirosol (ver **Tabla 2**). En cambio Ci todavía estaba poco madura y la concentración de oleuropeína era alta.

De donde deducen que la concentración de fenoles en un mismo día de cosecha podría servir para diferenciar una variedad de otra (Romani et al., 1999).

La coloración del fruto con la maduración se asocia con un descenso de clorofila y de oleuropeína, y la aparición de antocianinas. La distribución de antocianinas es muy restringida, quedando reducida al fruto maduro, apareciendo primero en la piel tanto en la parte distal como en la proximal, distribuyéndose luego al resto de la piel para abarcar después el mesocarpo (Ryan et al., 2002).

La síntesis de antocianinas requiere la presencia de azúcares libres, de hecho, el aumento de antocianinas con la maduración está por lo general correlacionada con la acumulación de azúcares. La disminución de la concentración de oleuropeína debe estar relacionada con esta acumulación y necesidad de azúcares. Uno de los productos de la degradación de la oleuropeína es el ácido elenólico glicosilado, que aumenta con la maduración, y en olivas se encuentra ácido elenólico libre. Asumiendo que el ácido elenólico libre es resultado de la degradación del ácido elenólico glicosilado, junto con el hecho de que la cantidad de azúcar disminuye con el desarrollo del fruto, la degradación parcial de este glucósido debe ser para alimentar el incremento de la demanda de azúcar necesaria para la producción de antocianinas en la

maduración. Los niveles de oleuropeína disminuyen a cero cuando el fruto está completamente negro (Ryan et al., 2002). La mayoría de los compuestos fenólicos se acumulan casi exclusivamente como conjugados. Parece haber varias razones para la conjugación; la ligera toxicidad de algunos compuestos se evita de esta manera, también se favorece la solubilidad y el depósito en ciertos compartimentos celulares. Parece estar relacionado también con el transporte de los compuestos a las células, e incluso transporte intracelular. Se propuso que los lípidos almacenados en la oliva eran sintetizados en la hoja y posteriormente transportados al fruto, de modo que es fácil asumir que existen fuertes relaciones metabólicas entre hojas y frutos (Ryan et al., 2002).

Es importante tener en cuenta que los metabolitos (ej. compuestos fenólicos) aislados de fuentes naturales no tienen porqué ser los mismos que se encuentran en los tejidos vivos. El propio proceso de extracción y purificación puede modificar las características, así, la exposición al oxígeno, solventes y cambios de pH produce cambios químicos en los compuestos fenólicos. Además, diferentes metabolitos se pueden producir en respuesta a infecciones microbianas, de modo que el espectro de metabolitos podría ser sinónimo del estado de salud del organismo. Por tanto el fruto se encuentra en un estado dinámico tal, que el nivel de metabolitos en un momento concreto representa el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas (Ryan et al., 2002).

Así, la concentración de compuestos fenólicos en el aceite de oliva puede ser muy variable, influyendo también la variedad, la situación geográfica del cultivo (latitud y longitud), las condiciones climatológicas durante el año de la cosecha (lluvia, grado de insolación, tormentas, ...) y el proceso de extracción. Ver la concentración de compuestos fenólicos en un aceite de oliva en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Concentración de compuestos fenólicos en aceite de oliva de la variedad *arbequina*.

Compuesto	Concentración μM
Ácidos fenólicos	
Ácido cinámico	0.29
Ácido cumárico	1.14
Ácido ferúlico	0.28
Ácido vainílico	0.78
Vainillina	1.77
Fenil etil alcoholes	
Hidroxitirosol	13.01
Tirosol	20.85
Secoiridoides	
3,4- DHPEA-AC	0.26
3,4- DHPEA-EDA	76.11
3,4- DHPEA-EA	45.34
Metil-3,4- DHPEA-EA	7.05
Oleuropeína derivado	1.48
ρ -HPEA-EDA	21.76
ρ -HPEA-EA	28.39
Ligstrósido derivado	2.50
Flavonoides	
Apigenina	1.39
Luteolina	6.96
Lignanos	
Pinoresinol	2.60
Acetoxipinoresinol	29.71
Fenoles totales	261.75

Fuente: Motilva, Universitat de Lleida.

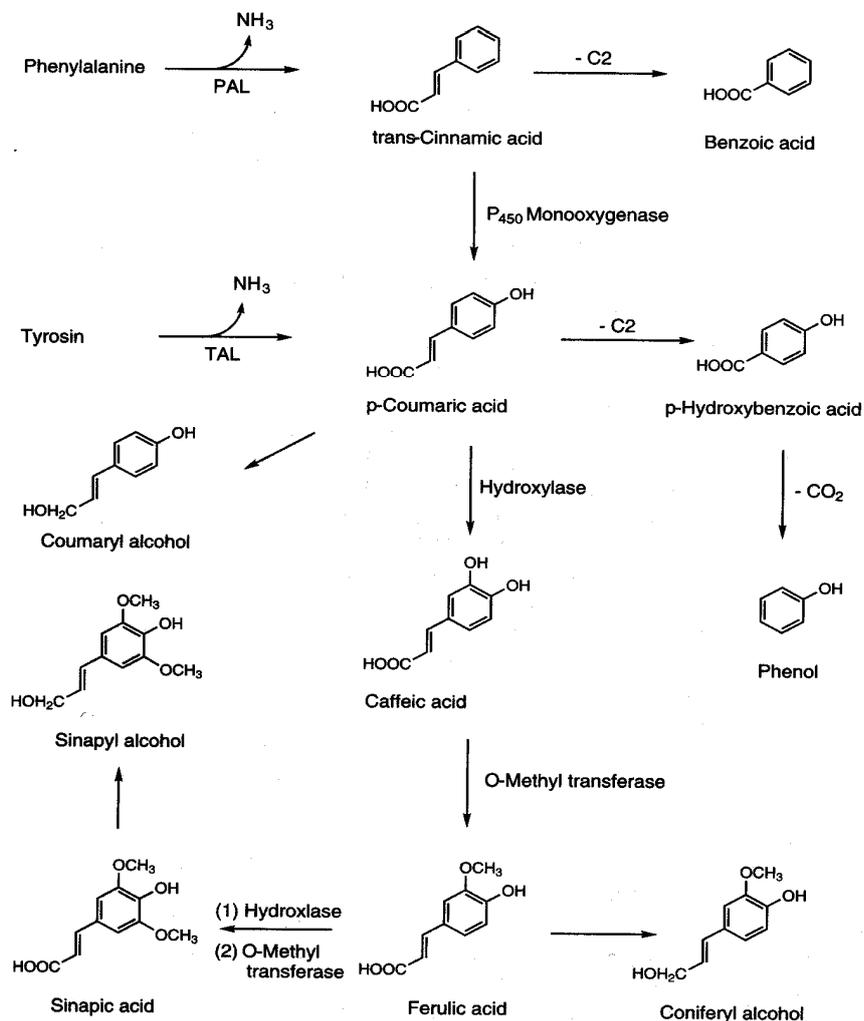
Química de los compuestos fenólicos

Origen de los compuestos fenólicos

La principal función de la fenilalanina es la producción de proteínas, no obstante, una parte se desvía de esta ruta, y la fenilalanina pasa a ser el precursor común de la síntesis de muchos de los compuestos fenólicos en plantas superiores, así como del grupo de las hormonas vegetales auxinas. Representa el substrato inicial en la serie de reacciones colectivas conocida generalmente como "metabolismo general fenilpropanoide", y el aporte de fenilalanina por la vía del shikimato parece ser una forma simple de controlar la síntesis de fenoles (Ryan et al., 2002).

En la ruta del shikimato (**Figura 2**), la actividad de la Fenilalanina amonio liasa (PAL) juega un papel muy importante en la producción total de fenoles siendo este paso altamente sensible a condiciones ambientales; los más importantes son aquellos que se pueden considerar estresantes como temperatura, luz ultravioleta y daños físicos de la planta. Su actividad también varía con el grado de maduración del fruto. Por lo que la concentración de compuestos será función de la actividad de dicha enzima.

Figura 2: Formación de compuestos fenólicos a partir de la fenilalanina.



La Fenilalanina amonio liasa es el punto de partida de la ruta de biosíntesis de muchos compuestos fenólicos. PAL: Fenilalanina Amonio Liasa, TAL: Tirosina Amonio Liasa (Shahidi and Naczki, 2004).

Clasificación metabólica de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se clasifican como metabolitos secundarios, siendo metabolitos primarios proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos y cofactores. Por el contrario, se consideran metabolitos secundarios compuestos de distribución mas restringida, y sin una función obvia en el metabolismo general (Ryan et al., 2002). No obstante, la distinción entre metabolito primario y secundario es algo confusa, dado que hay algunos aminoácidos que se podrían considerar metabolitos secundarios, mientras algunos esteroides (metabolitos secundarios) en muchos organismos tienen una función esencial y por tanto deberían considerarse metabolitos primarios. Además, hay que tener en cuenta que los dos metabolismos, primario y secundario, están interconectados, y el primario produce una serie de moléculas pequeñas que son utilizadas en el secundario (Ryan et al., 2002).

Si definimos los fenoles vegetales en términos de origen metabólico, son sustancias que proceden del metabolismo fenilpropanoide y de la ruta metabólica del Shikimato, como se ha mencionado en el apartado anterior. Sus pasos metabólicos son complicados, con variantes que difieren de un tejido a otro, de un estadio de crecimiento a otro y en respuesta a estímulos ambientales.

Su existencia en tejidos animales se debe generalmente a la ingestión de alimentos vegetales. También son incorporados

con la dieta fenoles sintéticos, dado que son usados para evitar la oxidación de la parte lipídica del alimento en el que se utiliza. Es también conocida su contribución como pigmentos en alimentos de origen vegetal. Además, funcionan como antibióticos, pesticidas naturales, marcaje químico para la formación de simbiosis, atrayentes de polinizadores, protectores frente a la luz ultravioleta, aislantes vegetales que permiten paredes celulares impermeables a gases y agua, y como material estructural que da estabilidad a las plantas (Shahidi and Naczk, 2004).

Japón Luján *et. al.* (Japon-Lujan et al., 2006) trabajaron con 13 variedades de olivos (Alameño, Arbequina, Azulillo, Chorna, Hojiblanca, Lechín, Manzanillo, Negrillo, Nevadillo, Ocal, Pierra, Sevillano Y Tempranillo), y seis zonas de cultivo diferentes de la variedad Arbequina. Basándose en los extractos de fenoles obtenidos por HPLC-DAD (*High Pressure Liquid Chromatography with Diode Array*) fueron capaces de asignar tanto la variedad como las diferentes zonas de cultivo. Los principales fenoles utilizados fueron oleuropeína, verbascósido, apigenina-7-glucósido y luteolina-7-glucósido. De modo que extractos de los principales polifenoles fueron utilizados como marcadores quimiotaconómicos.

El olivo, *Olea europea*, es una fuente de compuestos fenólicos con importantes propiedades (Ryan et al., 2002), ahora bien, mientras las olivas contienen fenoles complejos glicosilados, el aceite contiene su forma aglicona, es decir, la forma más liposoluble de su molécula (Visioli and Galli, 2002).

Los compuestos fenólicos del AOV pertenecen a diferentes clases: ácidos fenólicos, fenil etil alcoholes, flavonoides, lignanos y secoiridoides, siendo estos últimos característicos de la familia, y los más abundantes en la fracción fenólica (Bendini et al., 2007).

Clasificación química de los compuestos fenólicos

Químicamente los compuestos fenólicos se pueden definir como sustancias con un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (-OH), incluyendo sus derivados funcionales. En un principio, se hizo referencia a ellos como polifenoles (nomenclatura heredada del mundo vinícola), cuando el término más apropiado debería ser biofenoles (Uccella, 2001), en la actualidad, la tendencia es a denominarlos compuestos fenólicos. Por lo que utilizaremos dicho término.

La clasificación es variada y compleja, no existiendo una definitiva. Basándose en los grupos funcionales tenemos según Harborne flavonoides y no flavonoides (Harborne, 1999), pero en la clasificación de Uccella distinguen simples, complejo citoplasmático, esterificado e insoluble unido a pared celular (Uccella, 2001).

Basándonos en los trabajos de Spencer *et al.*, Bendini *et al.* y Girona *et al.* quedaría la siguiente clasificación, ver **Figura 3** (Bendini et al., 2007; D'Archivio et al., 2007; Girona et al., Submitted; Spencer et al., 2008). De todo ello se desprende la

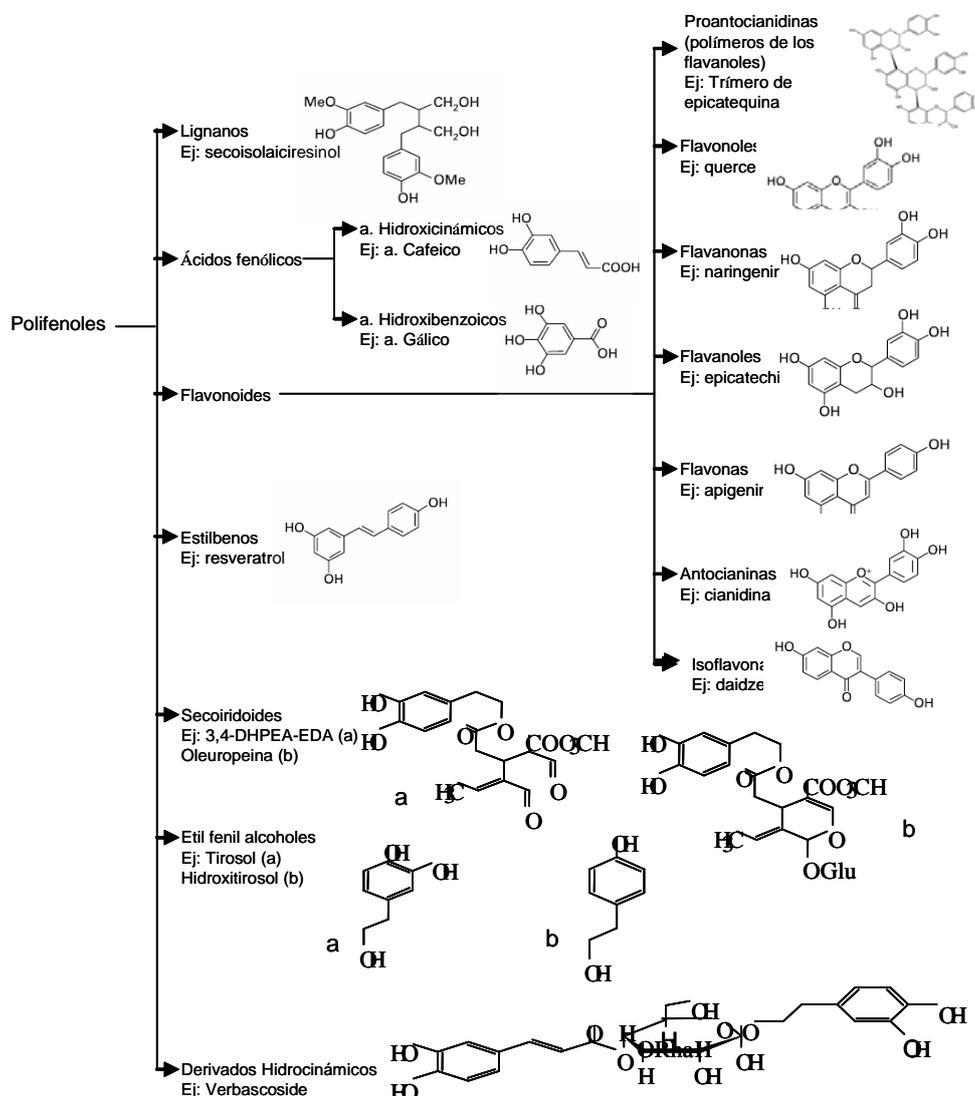
complejidad de integrar la extensa gama de compuestos fenólicos del mundo vegetal. A su vez, esta dificultad se traslada a la composición de estos compuestos de un producto concreto como es el aceite de oliva.

Ácidos fenólicos (Derivados del ácido benzoico y fenoles simples)

Los derivados del ácido benzoico se producen a partir de los fenilpropanoides, por la pérdida de una estructura de dos carbonos. La hidroxilación y posiblemente la metilación del ácido benzoico da lugar a la formación de los ácidos dihidroxibenzoico, vainílico, siríngico y gálico.

Convencionalmente los fenilpropanoides y los derivados de ácido benzoico son denominados de forma genérica "ácidos fenólicos" en la literatura alimentaria. No obstante esta nomenclatura no es necesariamente correcta desde el punto de vista químico y estructural, nos referiremos a ellos en cualquier caso como ácidos fenólicos.

Figura 3: Clasificación y estructura química de las clases de polifenoles más abundantes en la dieta.



Clasificación según Spencer, Bendini, D'Archivio y Girona (Bendini et al., 2007; D'Archivio et al., 2007; Girona et al., Submitted; Spencer et al., 2008).

La decarboxilación del ácido benzoico y los derivados fenilpropanoides da lugar a la formación de fenoles simples.

Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Contienen dos estructuras carbónicas diferenciadas, la hidroxicinámica y la hidroxibenzoica. Dilucidar su función es una importante rama de investigación. Los ácidos fenólicos se han asociado con el color y características sensoriales, así como con propiedades antioxidantes y relacionadas con la salud (Maga, 1978). Se ha investigado su relación con características organolépticas de los alimentos (sabor, amargor y dureza), también se ha estudiado el contenido de ácidos fenólicos y su efecto en la maduración del fruto, en la prevención en la aparición de la coloración marrón del fruto, y su función como conservantes alimentarios. Recientemente se ha empezado a estudiar el posible efecto de la ingestión de compuestos fenólicos de frutas y verduras frente a enfermedades relacionadas con daño oxidativo como enfermedad coronaria o cáncer (Bendini et al., 2007; Gomes et al., 2003; Masaki et al., 1997; Robbins, 2003; Sotiroudis and Kyrtopoulos, 2008; Waterman and Lockwood, 2007).

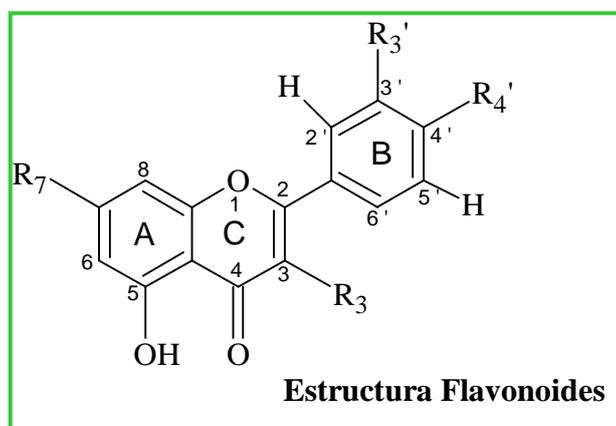
De entre los ácidos fenólicos se ha visto que el ácido trans-cinámico, ácido sináptico, ácido cafeico y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético están presentes en aceites de oliva virgen monovarietales de seis cultivares españoles analizados. Por tanto se podrían considerar marcadores geográficos de origen

de la variedad del fruto (Bendini et al., 2007; Buiarelli et al., 2004; Carrasco Pancorbo et al., 2004; Vlahov et al., 2003).

Flavonoides y estilbenos

Los flavonoides tienen el esqueleto básico del difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) con diferente grado de oxidación en el anillo pirano (**Figura 4**). Esta estructura es también aplicable a los estilbenos, pero en este caso presentan un segundo grupo fenil en la estructura. Los estilbenos son potentes funguicidas en plantas, como el viniferin de la uva, o antioxidantes y anticancerígenos como el resveratrol.

Figura 4: Esquema del esqueleto base a partir del cual se forman todos los flavonoides.



Fuente: (Beecher, 2003)

Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de amplia distribución. En las últimas décadas han aparecido gran número de publicaciones relacionadas con el efecto beneficioso de los flavonoides sobre la salud, cáncer y enfermedades coronarias (Birt et al., 2001; Kandaswami et al., 2005; Li et al., 2007; Ren et al., 2003; Sotiroudis and Kyrtopoulos, 2008; Waterman and Lockwood, 2007).

Son principalmente moléculas planas, "*planar molecules*", y su variación estructural proviene en parte de las modificaciones por hidroxilación, metoxilación, prenilación o glicosilación del esqueleto base C₆-C₃-C₆. Están generalmente glicosilados, con los azúcares unidos a un grupo -OH (o-glicosilflavonoide) o a través de una unión carbono-carbono (C-glicosilflavonoide), por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides agliconas se dividen en flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanoles dependiendo de la presencia de un grupo carbonilo en el carbono C-4, un -OH en el C-3, un doble enlace entre el C-2 y C-3, y la combinación de no carbonilo en el C-4 con un -OH en el C-3, respectivamente (Bendini et al., 2007), ver **Figura 5**.

Una función fisiológica bien conocida de antocianinas y flavonoides, pigmentos y copigmentos, es la reclutación de insectos polinizadores y dispersadores de semillas.

Figura 5: Clasificación y estructura química de los flavonoides según la disposición de los dobles enlaces.

Group	Description	Skeleton		Structural formula	Examples
		Functional groups			
		3-hydroxyl	2,3-dihydro		
Flavone	2-phenylchromen-4-one	X	X		Luteolin, Apigenin, Tangeritin
Flavonol or 3-hydroxyflavone	3-hydroxy-2-phenylchromen-4-one	✓	X		Quercetin, Kaempferol, Myricetin, Fisetin, Isorhamnetin, Pachypodol, Rhamnazin
Flavanone	2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one	X	✓		Hesperetin, Naringenin, Eriodictyol, Homoeriodictyol
Flavanonol or 3-Hydroxyflavanone or 2,3-dihydroflavanol	3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one	✓	✓		Taxifolin (or Dihydroquercetin), Dihydrokaempferol

Dentro de los flavonoides, antocianinas y catequinas se denominan conjuntamente flavanos, siendo importantes; flavan-3-ol y flavan-3,4-ol. Mientras charconas y flavonas son amarillas, las antocianinas son pigmentos solubles en agua, responsables de los colores rojo brillante, azul y violeta de otros alimentos. El rojo brillante de los rábanos, de las patatas rojas y de las berenjenas es debido a la presencia de antocianinas. Moras, frambuesas, arándanos, cerezas, granadas y ciruelas también tienen antocianinas (Shahidi and Naczki, 2004). Los flavonoides incluyen también muchas fitoalexinas.

En el caso concreto de las antocianinas se produce el efecto batocrómico, que consiste en que al cambiar la acidez (pH) se pasa del rojo anaranjado en condiciones ácidas, como el de la pelargonidina (R, R'=H), al rojo intenso-violeta de la cianidina (R=OH, R' = H) en condiciones neutras, y al rojo púrpura-azul de la delphinidina (R, R'=OH), en condiciones alcalinas.

En aceite de oliva, diversos autores citan la luteolina y la apigenina como flavonoides (Bendini et al., 2007; Bouaziz et al., 2005; Carrasco-Pancorbo et al., 2006; Morello et al., 2005; Murkovic et al., 2004). También se encuentran estudios interesantes que detectan flavonoides en hojas y frutos de olivo (Bendini et al., 2007; Bouaziz et al., 2005; Romani et al., 2000; Ryan et al., 2003).

Lignanos

Los lignanos y sus oligómeros, actúan como sustancias de defensa, así, el pinoresinol se produce cuando la planta es dañada y es tóxico para los microorganismos, y el magnolol inhibe el crecimiento bacteriano y fúngico; los efectos farmacológicos de los lignanos respecto a su actividad antiviral han sido demostrados (Shahidi and Naczki, 2004). El (+)-pinoresinol es un componente habitual de la fracción lignanos de muchas plantas, como las especies del género *Forsythia* (Davin et al., 1992) y las semillas de *Sesamum indicum*, mientras (+)-1-acetoxipinoresinol y el (+)-1-hydroxipinoresinol y sus respectivas formas glucosadas se han

detectado en corteza de olivo (*Olea europea* L.). Según Brenes et al. (Brenes et al., 2002; Brenes, 2000) la cantidad de lignanos presente en el aceite de oliva podría ser utilizado como marcador de variedad, y aportan un método para autentificar el AOV producido con olivas de la variedad Picual basado en el bajo contenido de (+)-1-acetoxipinoresinol en estos aceites (Bendini et al., 2007). Comparando el contenido en compuestos fenólicos de aceites de oliva de cultivares españoles e italianos, Oliveras-López y colaboradores, llegan a la conclusión de que los aceites que contienen altas cantidades de lignanos generalmente muestran bajos niveles de secoiridoides (Oliveras-Lopez et al., 2007).

Secoiridoides

Bajo la denominación de iridoides se agrupan una serie de compuestos bicíclicos derivados biosintéticamente del geraniol, que presentan como estructura básica común un ciclopentapirano denominado iridano, por haberse detectado por primera vez en unas hormigas pertenecientes al género *Iridomirmex*. Estos compuestos pueden encontrarse como estructuras abiertas (secoiridoides) o cerradas (iridoides), y mayoritariamente glucosilados, produciéndose a partir del metabolismo secundario de los terpenos.

Los secoiridoides, exclusivos de la familia *Oleaceae*, ej. olivo *Olea europea* L., se caracterizan por la presencia del ácido

elenólico en su estructura molecular, tanto en la forma glicosilada como en la aglicona. Están formados por un fenil etil alcohol (tirosol o hidroxitirosol), el ácido elenólico y eventualmente una glucosa. La oleuropeína (3,4-DHPEA-EA) es un ester del hidroxitirosol (3,4-DHPEA) y el ácido elenólico (EA) glucosado (**Tabla 4**).

El secoiridoide oleuropeína confiere el sabor amargo a las olivas y se encuentra en muy baja concentración en el aceite, aunque fundamentalmente en su forma aglicona. Lo descubrieron y nombraron Bourquelot y Vintilesco (Bourquelot and Vintilesco, 1908) y fue investigado por primera vez en humanos por Panizzi *et al.* (Panizzi et al., 1960) quien publicó sobre las propiedades hipotensoras de este compuesto fenólico aislado de las hojas de los olivos. Constituye el 14% del peso seco de las olivas verdes (Amiot et al., 1986) y es hidrolizada durante la maduración de la oliva (Barz et al., 1985) rindiendo varias moléculas más simples que incluyen el 3,4-DHPEA-EDA, que posteriormente es hidrolizado a hidroxitirosol (3,4-DHPEA) y ácido elenólico.

Los secoiridoideos más abundantes en el AOV son la forma dialdehídica del ácido elenólico (EDA) unido al hidroxitirosol o tirosol, denominados respectivamente 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA, y un isómero de la oleuropeína aglicona 3,4-DHPEA-EA (Bendini et al., 2007).

Tabla 4: Secoiridoides más abundantes del aceite de oliva.

Compuesto	Siglas	Formación
Tirosol	ρ -HPEA	Hidroxi Phenil Etanol
Hidroxitirosol	3,4-DHPEA	Di Hidroxi Phenil Etanol
Ácido elenólico	EA	Elenolic Acid
Ác elenólico dialdehído	EDA	Elenolic Acid Dialdehido
Ligstrosido	ρ -HPEA-EA	éster T + EA
	ρ -HPEA-EDA	éster T + EDA
Oleuropeína	3,4-DHPEA-EA	éster H +EA
	3,4-DHPEA-EDA	éster H +EDA

Siglas químicas y su formación. T: tirosol, H: hidroxitirosol, EA: ácido elenólico, EDA: ácido elenólico dialdehído.

Taninos

Tanino es un término colectivo que incluye variedad de fenoles vegetales utilizados en el curtido de las pieles. Son fenoles capaces de precipitar proteínas de soluciones acuosas y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Abundan especialmente en la corteza del roble. Dependiendo de su estructura, se definen como hidrolizables o condensados. Estos últimos se conocen como proantocianidinas, son oligómeros y polímeros de flavonoides, especialmente flavan-3-ol, mientras que los hidrolizables son estructuras formadas por ácidos gálicos unidos a azúcares, como galotaninos y elagitaninos.

Los grupos fenólicos de los taninos se unen débilmente a grupo nitrilo (-NH) de proteínas y péptidos previniendo así su hidrólisis y digestión en estómago, por lo que son considerados "antinutrientes". En el proceso de curtido los taninos se unen al colágeno de la piel del animal impidiendo su degradación, igualmente protegen las plantas del ataque de microorganismos (Shahidi and Naczk, 2004).

Compuestos fenólicos y sabor en el aceite de oliva.

Los compuestos fenólicos confieren el sabor amargo y penetrante al aceite de oliva como resultado de las interacciones complejas entre los componentes minoritarios y las papilas gustativas.

Los aceites de oliva de mejor sabor son ricos en compuestos fenólicos y recuerdan al sabor de la alcachofa, pimiento y chile, según paneles de catadores. Estos paneles evalúan la calidad organoléptica del aceite y sus posibles fallos, no obstante, un elevado contenido de fenoles puede dar lugar a un sabor excesivamente amargo y no es sinónimo de calidad. Los aceites con elevado contenido en compuestos fenólicos son muy estables y tienen un fuerte sabor afrutado, lo cual indica una elevada cualidad organoléptica del aceite, aunque quizá no la más deseada (Visioli and Galli, 2002).

Biodisponibilidad en humanos.

Antes de ejercer su efecto antioxidante los polifenoles necesitan llegar a su diana dentro del organismo. Empieza un largo y complicado viaje desde el olivo, vía la boca hasta las células. Tras la ingestión, los polifenoles, contenidos en el aceite de oliva o en las aceitunas de mesa llegan al torrente circulatorio, desde donde se facilita su distribución para la absorción por tejidos y órganos. Se sabe que:

- a) La concentración de los compuestos fenólicos aumenta rápido tras la ingesta de aceite de oliva y alcanza un pico en plasma aproximadamente 1 hora después de la ingesta (Miro-Casas et al., 2003a; Visioli et al., 2000b; Weinbrenner et al., 2004b) y 0-2 horas en orina (Miro-Casas et al., 2003a; Miro-Casas et al., 2001).
- b) El hidroxitirosol y tirosol son los compuestos fenólicos más característicos del aceite de oliva (Servili et al., 2004).
- c) Se encuentra hidroxitirosol y tirosol en humanos a partir de dosis (22 - 25 mg/día) menores que las acostumbradas en la dieta mediterránea, 30-50 g/día (Marrugat et al., 2004).
- d) El hidroxitirosol y tirosol del aceite de oliva son absorbidos de forma dosis-dependiente y pueden acumularse en el cuerpo tras un consumo, aunque presentan una vida media muy baja en plasma (Miro-Casas et al., 2003a; Visioli et al., 2000b; Weinbrenner et al., 2004a).

- e) Las concentraciones en orina de tirosol han demostrado ser dosis-dependientes, mientras que las de hidroxitirosol tienden a acumularse (Miro-Casas et al., 2003b).
- f) Aproximadamente el 98% de ellos están presentes en plasma y orina en su forma conjugada, sugiriendo que las formas primarias ingeridas han sufrido metabolismo hepático e intestinal (Caruso et al., 2001; Miro-Casas et al., 2003a).
- g) Las formas libres del hidroxitirosol y tirosol y sus derivados secoiridoides representan aproximadamente el 30% del contenido total de compuestos fenólicos del AOV, mientras que otras formas conjugadas como oleuropeína y ligstrósido agliconas representan menos de la mitad (Owen et al., 2000b).

Por todos estos datos, se puede considerar el tirosol e hidroxitirosol como biomarcadores de compuestos fenólicos del consumo de aceite de oliva y son una herramienta muy útil para la monitorización de ensayos clínicos.

Se ha propuesto que los compuestos fenólicos no absorbibles pueden ejercer actividades antioxidantes en el tracto intestinal (Ursini et al., 1998) basado en la actividad captadora de radicales libres de los compuestos fenólicos generados por la matriz fecal (Owen et al., 2000a) y la inducida por las células epiteliales intestinales (Manna et al., 1997).

Finalmente, hay que tener en cuenta que la forma del compuesto fenólico también es importante, dado que suelen

presentarse en los alimentos como compuestos conjugados. Todos estos aspectos hay que tenerlos en cuenta en el diseño de estudios experimentales en el campo de los polifenoles (Mennen et al., 2005).

Antes de diseñar los estudios de intervención para evaluar los efectos de los polifenoles sobre enfermedades crónicas, con el uso de alimentos enriquecidos o con suplementos, se debe realizar una evolución de la dosis segura a utilizar, con el fin de evitar situaciones no éticas. Antes de todo esto se debe acumular suficiente información *in vitro*, en animales, estudios de observación epidemiológica sobre las dosis, que permita adscribir un efecto beneficioso al consumo total de polifenoles o a uno en concreto (Mennen et al., 2005).

Oxidación

Estrés oxidativo

Se define el estrés oxidativo como el desequilibrio entre los sistemas oxidante y antioxidante del cuerpo a favor de los oxidantes (Fito et al., 2007a). Los sistemas oxidantes son radicales libres, moléculas o fracciones de moléculas que contienen más de un electrón sin aparear. Los radicales derivados del oxígeno, incluidos en las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) porque se producen a través de la reducción parcial de oxígeno, como el anión superóxido (O_2^-), el radical $-OH$ y el peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) representan la mayor clase de radicales libres, junto con los derivados de nitrógeno llamados especies reactivas de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*), generados bajo situación de hipoxia. Éstos, pueden oxidar los ácidos grasos y con ello la LDL (*Low Density Lipoprotein*); esta modificación oxidativa de la LDL tiene un papel muy importante en el desarrollo de la arterosclerosis y la enfermedad cardiovascular.

En la actualidad se considera que la LDL oxidada es más dañina para la pared arterial que su forma nativa (Navab et al., 1996). Concentraciones elevadas de LDL circulante oxidada muestran una relación positiva con la severidad de eventos coronarios agudos (Holvoet et al., 2001) y están íntimamente asociados con el grosor de la capa íntima media de la arteria carótida común (Liu et al., 2004).

Hasta la fecha se ha atribuido la mayor parte de los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos en la salud humana a su capacidad antioxidante, demostrada en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se pudieron iniciar ensayos para elucidar la actividad antioxidante de la oleuropeína y tirosol gracias a la disponibilidad de los mismos a finales de los años 90. La oleuropeína y el hidroxitirosol son accesibles comercialmente y pueden aislarse puros a partir del AOV (Capasso et al., 1999).

Evidencia in vivo de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos del aceite de oliva

Visioli y sus colaboradores demostraron que la absorción del hidroxitirosol administrado a ratas como único componente bioactivo del extracto de las aguas de vegetación es dosis dependiente y es capaz de incrementar la capacidad antioxidante del plasma (Visioli et al., 2001).

También se ha observado que dosis bajas de hidroxitirosol, 414 µg/kg, son capaces de inhibir el estrés oxidativo inducido por la respiración pasiva de humo de cigarrillos en ratas (Visioli et al., 2000a; Visioli et al., 2000c).

Estudios en humanos

Los estudios de Manna y los de Lamersdorf sugieren que el hidroxitirosol entra en compartimentos celulares humanos donde ejerce su actividad antioxidante (Lamensdorf et al., 2000; Manna et al., 1999).

Bonanome y sus colaboradores demostraron la absorción postprandial en humanos de compuestos fenólicos del aceite de oliva y su incorporación en lipoproteínas (Bonanome et al., 2000).

Posteriormente Visioli y colaboradores, en un estudio con pacientes dislipidémicos (VOLOS) investigaron las actividades de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Evaluaron la capacidad antioxidante y los niveles de tromboxano B2 (TXB2) en 22 pacientes dislipidémicos que habían recibido 40 ml/día de AOV extra, rico en compuestos fenólicos, o aceite de oliva refinado, pobre en compuestos fenólicos, con un diseño

cruzado (Visioli et al., 2005b). Tras siete semanas de dieta enriquecida en AOV se observó un marcado descenso en la producción en plasma de TXB₂, viéndose revertido este efecto tras la administración de aceite de oliva refinado. Asimismo, se evaluó la capacidad antioxidante en plasma (medida como μM de Cu^{2+} reducido), observando tras siete semanas de dieta enriquecida con AOV, una mejoría en la capacidad antioxidante y ningún cambio en los pacientes que recibieron aceite de oliva refinado. Es interesante resaltar que las cantidades de compuestos fenólicos (166 mg en AOV extra, y 0.08 mg en aceite refinado) administrados a los pacientes de este estudio son comparables a las cantidades consumidas por muchas poblaciones del área mediterránea.

Los datos de estudios en humanos aleatorios, controlados, cruzados de aceite de oliva con dosis a las cuales se produce estrés oxidativo muestran un incremento en la capacidad antioxidante en suero tras la ingesta de AOV pero no de aceite de oliva refinado, en comparación con aceite de maíz; lo cual sugiere que los compuestos fenólicos del AOV muestran actividad antioxidante (Bogani et al., 2007) y que el contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva modula el grado de oxidación lipídica de la LDL, de tal forma que se observa menor oxidación lipídica tras la ingesta de un aceite de oliva con alta concentración en compuestos fenólicos que tras la ingesta de un aceite de oliva con baja concentración (Covas et al., 2006a; Ruano et al., 2005). Hay que mencionar que los resultados de estos estudios hasta el año 2004 en los que se

administraron dosis sostenidas de compuestos fenólicos del aceite de oliva son controvertidos (Marrugat et al., 2004; Moschandreas et al., 2002; Visioli et al., 2005b; Vissers et al., 2001; Weinbrenner et al., 2004a). Existen grandes diferencias en el diseño de los estudios, control de la dieta, tamaño de la muestra, edad de los participantes, medida o no de los marcadores y en la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados. Basado en los estudios mencionados, el Panel de Expertos en la Conferencia Internacional de Aceite de Oliva y Salud, que tuvo lugar en Jaén en Octubre de 2004, concluyó: 1) que los datos sobre los efectos beneficiosos en humanos de las cantidades habituales de compuestos fenólicos del aceite de oliva eran controvertidos; 2) que los efectos protectores en la oxidación de lípidos en estos ensayos clínicos se mostraban mejor en condiciones de estrés oxidativo (como es el caso del estrés postprandial) y en los marcadores asociados a la oxidación de LDL; y 3) son necesarios estudios controlados cuidadosamente en poblaciones apropiadas (individuos con status de elevado estrés oxidativo), o de gran tamaño de muestra (en el caso de individuos sanos) para poder establecer definitivamente en qué condiciones pueden ejercer los compuestos fenólicos del aceite de oliva el mayor efecto beneficioso controlando el estrés oxidativo (Covas et al., 2006c; Pérez-Jiménez et al., 2004). Sin embargo, los resultados del estudio EUROLIVE (*The effect of olive oil consumption on oxidative damage in European populations*) han mostrado evidencia *in vivo*

recientemente sobre el efecto protector de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la oxidación de lípidos en humanos con cantidades habituales de aceite de oliva (Covas et al., 2006b). El proyecto EUROLIVE es un ensayo clínico grande, cruzado, multicéntrico realizado en 200 individuos de 5 países europeos. Se asignó a los pacientes de forma aleatoria que recibieran una dosis de 25 ml/día de tres aceites de oliva con diferente contenido en compuestos fenólicos (entre 2,7 mg/kg y 366 mg/kg de aceite de oliva) en periodos de intervención de 3 semanas precedidos por periodos de 2 semanas de lavado ("wash out"). Todos los aceites de oliva incrementaron la concentración de colesterol de las HDL (*High Density Lipoprotein*) y el ratio entre las formas reducidas y oxidadas de glutatión. La actividad antioxidante de la HDL sobre la peroxidación de lípidos es bien conocida (Fogelman, 2004) y el glutatión reducido es un mecanismo importante para la protección celular contra el estrés oxidativo (Hayes and McLellan, 1999). En el estudio EUROLIVE, el consumo de aceite de oliva con contenidos medio y alto en compuestos fenólicos, disminuyó el deterioro oxidativo observado en biomarcadores de oxidación como la LDL oxidada en plasma. El incremento en colesterol de las HDL y la disminución en el deterioro oxidativo es lineal con respecto al contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva consumido. Los resultados de este estudio produjeron evidencia de primer nivel de que el aceite de oliva es algo más que grasa monoinsaturada.

Por otro lado, la cantidad de compuestos fenólicos unidos a la LDL humana aumenta de forma dosis-dependiente con el contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva administrado (Covas et al., 2006a). De la Torre y colaboradores han publicado recientemente la unión a LDL de metabolitos de hidroxitirosol y tirosol, glucurónidos y sulfatos tras la ingesta de AOV (de la Torre-Carbot et al., 2007). La susceptibilidad de la LDL a la oxidación depende de su contenido en grasa y en agentes antioxidantes unidos a la LDL (Fuller and Jialal, 1994). Los compuestos fenólicos que pueden unirse a la LDL probablemente podrán realizar su actividad de captación de grupos peroxilo en la capa íntima arterial, donde normalmente ocurre la oxidación de la LDL.

Enzima Conversora de Angiotensina

La enzima conversora de la angiotensina (ECA) es una glicoproteína dipeptidasa hidrolasa unida a la membrana (Wei et al., 1991), metalopeptidasa en la cual el ión de Zn^{2+} del centro catalítico activo es esencial para la actividad enzimática (Liu et al., 2003). Sus funciones principales son lisar el péptido histidil-leucina de la angiotensina I formando el poderoso vasoconstrictor angiotensina II. Hay dos isoenzimas de la ECA, denominadas somática y germinal, porque se expresan en células somáticas y germinales (testiculares), respectivamente. La forma somática, presenta dos centros catalíticos activos: -N y -C terminal con diferentes afinidades por el sustrato, siendo el -C terminal el que tiene una mayor relevancia en la conversión de angiotensina I a angiotensina II. Por el contrario la ECA testicular presenta un sólo centro activo, idéntico al -C terminal de la ECA somática (Fuchs et al., 2008). La inhibición de ECA es un importante tratamiento para la elevada presión arterial y se considera que puede ser también un buen tratamiento para la disfunción renal y la insuficiencia cardíaca (Wong et al., 2004).

La administración terapéutica de ciertos inhibidores de la ECA (IECA) se ha asociado con efectos positivos en la salud que van más allá de la regulación de la presión arterial (Schiffirin, 2002). Cavanagh y colaboradores postulan que parte de los efectos beneficiosos asociados a la inhibición del sistema renina-angiotensina son debidos a la prevención del daño

oxidante que produce la angiotensina II (de Cavanagh et al., 2004). Es más, inhibidores de la ECA como enalapril pueden proteger de los efectos deteriorantes de la edad atenuando el daño oxidante en la mitocondria, preservando de ese modo la función mitocondrial. Los mecanismos asociados a dicha atenuación podrían estar relacionados con la reducción en la producción de anión superóxido dependiente de angiotensina II y/o el incremento en la detoxificación de RNS y ROS (de Cavanagh et al., 2004).

Numerosos estudios realizados en los últimos años han contribuido a ampliar la visión sobre la influencia que ejerce la angiotensina II. Históricamente, la angiotensina II se consideraba como un importante regulador de los sistemas cardiovascular y renal debido a sus efectos vasoconstrictor, cronotrópico positivo, modulador del crecimiento celular y su capacidad de regular la excreción de sodio y agua y la hemodinámica renal (Lahera et al., 2000). Se ha conocido recientemente que, además de estas funciones, la angiotensina II es capaz de inducir la producción de citokinas inflamatorias, de ROS y de tener acciones protrombóticas, al modificar el balance fibrinolítico. Todos estos efectos los realiza a través de la activación de diversas proteínas-quinasas y factores de transcripción (Ruiz-Ortega et al., 2001; Schmidt-Ott et al., 2000). Como consecuencia de estas acciones, se ha implicado a la angiotensina II en el mantenimiento y la progresión de las alteraciones vasculares que se producen en la hipertensión, la diabetes y la aterosclerosis. Más

recientemente se ha observado la producción local de angiotensina II en numerosos órganos incluyendo riñón, sistema vascular, corazón, glándula adrenal, ojo, testículo y cerebro (Bader and Ganten, 2008).

Efecto del aceite de oliva en la Hipertensión

Al igual que para otros aspectos de enfermedades cardiovasculares, se ha observado una incidencia menor de hipertensión en poblaciones que siguen la dieta mediterránea, y la adherencia a la dieta mediterránea está inversamente relacionada con la presión sistólica y diastólica (Carollo et al., 2007; Perona et al., 2006). Varios estudios han demostrado las propiedades antihipertensivas del aceite de oliva (Alonso et al., 2006; Ferrara et al., 2000; Tuck and Hayball, 2002). Gilani y colaboradores observaron que la administración intravenosa de extracto de aceite de oliva redujo la presión sistólica, diastólica y media en ratas con presión arterial normal (Gilani et al., 2005). Datos epidemiológicos de tres países mediterráneos – Italia, Grecia y España – y otros no mediterráneos, sugieren un efecto protector del aceite de oliva (Alonso et al., 2006).

Ferrara y sus colaboradores compararon una dieta rica en PUFA (de aceite de girasol) con una dieta elevada en MUFA (aceite de oliva) en pacientes que tomaban medicación antihipertensiva (Ferrara et al., 2000), y observaron que los

individuos que siguieron una dieta rica en aceite de oliva, redujeron la dosis de medicación.

El mecanismo de acción por el cual el aceite de oliva influye en la reducción de la presión arterial no se conoce todavía. Otros mecanismos observados están relacionados con la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y el efecto que ésta desencadena en una serie de acciones intra y extra-celulares que conducen a mejora de la función endotelial (Alonso et al., 2006; Perona et al., 2006), a través de la reducción de ROS (Perona et al., 2006), disminución del tono vascular y cambios en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos en la aorta (Ferrara et al., 2000) que conducen a la reducción de la presión arterial.

Péptidos lácteos

Las bacterias ácido-lácticas se han empleado para fermentar o crear cultivos de alimentos durante al menos 4 milenios. Su uso más corriente se ha aplicado en todo el mundo a los productos lácteos fermentados, como el yogurt, el queso, la crema de leche, el kéfir. Aunque sin comprender la base científica que explicase su acción, numerosos pueblos utilizaban estas bacterias hace ya miles de años para la elaboración de alimentos modificados, que podían conservarse mucho más tiempo, y estaban dotados de texturas y sabores característicos distintos de los del producto original.

Los principales cambios químicos que sufre la leche durante la fermentación, debido a las bacterias ácido-lácticas, son la hidrólisis de algunas proteínas así como la formación de ácido láctico a partir de la lactosa. Como muchos *Lactobacillus* no son capaces de sintetizar algunos aminoácidos, hidrolizan las proteínas de la leche, y los péptidos y aminoácidos obtenidos son utilizados para su crecimiento. Como resultado de todo el proceso, en la leche fermentada aumentan los niveles de aminoácidos libres y péptidos.

Se han llevado a cabo grandes esfuerzos con el fin de localizar sustancias hipotensoras en alimentos, y quizá entre las mejor estudiadas se encuentran los péptidos lácteos. Desde hace ya más de 80 años en Japón se comercializa una lecha fermentada con reconocidos efectos hipotensores, Calpis® que se produce por la inoculación de un cultivo que contiene *Lactobacillus helveticus* y *Sacharomices cerevisiae* como organismos predominantes. Para determinar si la leche fermentada realmente contenía péptidos IECA (Nakamura y colaboradores en el año 95) estudiaron el cambio en la actividad de dicha enzima durante la fermentación; y debido al aumento de actividad durante la fase estacionaria del cultivo, se puede deducir que estos péptidos inhibidores se forman durante dicho proceso, atribuyéndoseles la mayoría de la actividad inhibidora de la leche fermentada (*Calpis® sour milk*). Se identificaron dos péptidos Isoleucina-Prolina-Prolina (IPP) y Valina-Prolina-Prolina (VPP) ver **Tabla 5**, el primero ya se conocía como secuencia incluida en el extremo -C terminal

de péptidos potenciadores de la bradiquinina; para VPP se describía esta actividad por primera vez (Nakamura et al., 1995a; Takano, 2002).

Tras los trabajos con *Lactobacillus*, se han buscado otras fuentes bacterianas como formadoras de péptidos inhibidores. En leche fermentada con *Enterococcus faecalis*, se aisló la secuencia LHLPLP (ver anexo de la nomenclatura de aminoácidos), inhibidora de la ECA (**Tabla 5**); igual que en el caso anterior, se pudo confirmar que es durante la fermentación cuando aparece dicho péptido. A las 20h de fermentación la concentración del péptido alcanza el umbral, no siendo necesario más tiempo de incubación para aumentar la producción del péptido (Quiros et al., 2006). En un estudio con suero lácteo caprino (subproducto de la industria alimentaria) tras fermentación con microflora de diferentes tipos de queso, se detectó un péptido con un capacidad de inhibición del 56% de la actividad de la ECA (porcentaje de inhibición). Se trabajó con la microflora del queso "Compté" de 18 meses de maduración, básicamente formada por *Candida parapsilosis* y *Lactobacillus paracasei*. La acidificación del medio por parte de *Lactobacillus paracasei* supone la activación de *Candida parapsilosis* que libera al medio una o varias proteasas capaces de hidrolizar la lactoalbúmina. Tras simular una digestión gastrointestinal, su capacidad inhibitoria no parece variar, por lo que se podría investigar su efecto *in vivo* (Didelot et al., 2006).

También se han buscado péptidos inhibidores en leches fermentadas con *kéfir* (ver **Tabla 5**). En este caso, no se trata se una sola variedad bacteriana, ya que los gránulos de *kéfir* son complejos y están formados por una unión simbiótica entre bacterias ácido lácticas y levaduras. En el trabajo de Quirós y colaboradores, utilizaron gránulos que contenían *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus* biovar. *Diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, y la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *Fragilis* (Torula Kefir). Detectando dos péptidos con una fuerte actividad inhibitoria, PYVRYL y LVYPFTGPIPN (**Tabla 5**). Esta alta actividad IECA detectada en el extracto de *kéfir* en agua, con un IC₅₀ de 0.365 mg/ml (concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática), puede tener su explicación en el hecho de que la fermentación sea llevada a cabo por esa compleja unión de cepas bacterianas y levadura. Los resultados sugieren que los péptidos pequeños son los responsables de la actividad IECA en el *kéfir* caprino (Quiros et al., 2005).

A partir de hidrólisis enzimáticas de proteínas lácteas, se han detectado otros muchos péptidos IECA (Yamamoto and Takano, 1999). A partir de sus secuencias se han podido extrapolar una serie de características comunes.

Características de los péptidos

1. **Tamaño:** Los péptidos pequeños (pocos aminoácidos) contribuyen considerablemente a la actividad IECA frente a otros de mayor tamaño.
2. **Prolina:** La Prolina como aminoácido en el extremo C-terminal, ha sido reconocido como uno de los residuos más favorables para la unión del péptido al sitio activo de la enzima.
3. **Estructura en anillo:** Esta superioridad de la Prolina se debe probablemente a su estructura de anillo, que debe disponer el grupo carboxilo en una conformación favorable para la interacción con el residuo positivo del sitio activo de la enzima. Otros aminoácidos aromáticos (Triptófano, Tyrosina y Fenilalanina) también favorecen la unión.
4. **Secuencia del péptido:** La correlación estructura-actividad indica que la secuencia del tripéptido terminal juega un papel muy importante en la actividad IECA.
5. **Posición en el péptido:** La ECA también presenta alta esteroespecificidad con el residuo aminoácido de la posición 3 desde el extremo C-terminal, pero muestra poca importancia al residuo 4.
6. **Carácter hidrofóbico:** La propiedad hidrofílica/hidrofóbica del péptido es un factor importante que afecta a la actividad inhibitoria, dado que los péptidos detectados tienen un fuerte carácter hidrofóbico.

Para hacer referencia a la capacidad inhibitoria de los péptidos, se utiliza tanto el porcentaje de inhibición (**% INH**),

o descenso de actividad debido a la presencia del compuesto, como el **IC₅₀**, o concentración necesaria de compuesto para inhibir el 50% de la actividad enzimática. Un valor bajo de IC₅₀ se corresponde con una alta capacidad inhibitoria, dado que se requerirá poca cantidad de compuesto para alcanzar el umbral del 50% de inhibición.

(Li et al., 2004; Miguel et al., 2006b; Nakamura et al., 1995a; Nakamura et al., 1995b; Quiros et al., 2005; Quiros et al., 2007; Takano, 2002).

Unión ECA-péptido

La ECA es una enzima crucial en la regulación del sistema renina angiotensina, es una peptidil dipeptidasa hidrolasa que contiene zinc (Zn²⁺). Su sitio activo consiste en tres partes:

- grupo carboxilo funcionalmente activo para la unión, como el grupo "guanidinium" de la arginina
- un bolsillo o "pocket" que acoge el extremo hidrofóbico de la cadena del residuo aminoácido C-terminal
- el ión Zn²⁺

El ión Zn²⁺ de la enzima se coordina con el sustrato a través del grupo carbonilo del penúltimo enlace. Éste se polariza y es susceptible de ataque nucleotídico (Kang et al., 2003; Loizzo et al., 2007; Oh et al., 2004).

Estudios con péptidos lácteos

Estudios diversos han comprobado el efecto de péptidos IECA en animales. Por lo general el modelo animal elegido son ratas hipertensas espontáneas (SHR) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) como control. La capacidad inhibidora de los péptidos no siempre se correlaciona con el efecto antihipertensivo *in vivo*.

Se había determinado que la cantidad de VPP e IPP necesaria para inhibir el 50% de la ECA (IC₅₀) era de 9 y 5 μ M, respectivamente. Para comprobar si IPP y VPP tenían efecto antihipertensivo, los dos péptidos fueron químicamente sintetizados y se probó su efecto sobre la presión arterial en SHR y normotensas WKY. Se les dio una sola dosis oral de VPP (0.6 mg/kg de peso) y de IPP (0.3 mg/kg). Aunque la presión arterial del grupo control de SHR al que se le había administrado caseína no cambió significativamente, sí que se detectó un descenso significativo de la presión sistólica unas horas después de la administración de los tripéptidos (Takano, 2002). Se vió que el efecto de la leche fermentada era algo superior al de cada péptido por separado. El efecto revertía 24h después de la administración, y la presión sistólica volvía a los valores iniciales (Nakamura et al., 1995b). En un estudio a largo plazo, el desarrollo de la hipertensión fue atenuado en SHR por la administración de IPP y VPP, por lo que estos resultados sugieren que la leche fermentada tiene ambos efectos, uno a corto plazo como antihipertensivo con una sola

dosis oral, y otro a largo plazo como prevención en el desarrollo de la hipertensión (Takano, 2002).

Para determinar la relación dosis respuesta de los tripéptidos, se midieron los cambios de presión sistólica 6 horas después de una sola administración oral de VPP e IPP a diferentes dosis. Ambos péptidos mostraban una actividad dosis dependiente hasta 5 mg/kg de peso del animal. Estos datos sugieren que tanto un péptido como el otro juegan un papel esencial en la regulación de la presión arterial en la leche fermentada Calpis[®]. Por el contrario, trabajando con ratas normotensas WKY no varió la presión sistólica tras la administración de los péptidos aunque se utilizaron dosis superiores a las efectivas en SHR. Por tanto, el efecto de descenso de la presión arterial (antihipertensivo) de dichos péptidos parece ser específico de un estado hipertensivo (Takano, 2002).

Para profundizar más en este efecto antihipertensivo se midió la actividad de la ECA en varios tejidos tras un periodo largo de alimentación con la leche fermentada Calpis[®] en SHR. Tanto la presión sistólica como la actividad ECA en aorta de SHR alimentadas con la leche fermentada eran significativamente menores que en el caso de ratas control alimentadas con una dieta control (Nakamura et al., 1996). En esta misma línea, Masuda y colaboradores (Masuda et al., 1996), en el año 1996 trabajando con ratas SHR a las que se les administra una sola dosis oral de leche fermentada Calpis[®], detectan IPP y VPP en aorta abdominal. Es la primera vez que

péptidos biológicamente activos derivados de proteínas alimentarias se detectan intactos en su órgano diana tras la administración; por el contrario, estos péptidos no fueron detectados en SHR a las que se les administró suero salino o leche no fermentada acidificada artificialmente. Por tanto, la inhibición de ECA en aorta puede jugar un papel importante en el efecto antihipertensivo de la leche fermentada (Takano, 2002). Esto sugiere que los péptidos no se forman en el organismo de la rata a partir de la proteína láctea, y que no son degradados por las enzimas digestivas, siendo absorbidas y transportadas a aorta en su forma intacta (Masuda et al., 1996).

A partir de leches fermentadas con *Enterococcus faecalis* se detectaron otras secuencias con efecto IECA, que al igual que IPP y VPP presentaban una Prolina en el extremo carboxilo terminal: LVYFPFGPIPNLQNIIP, VLGPVVRGPF, LHLPLP, LHLPLPL. LHLPLP presentaba un IC₅₀ de 5.5 µM. La disminución de la presión sistólica y diastólica en ratas SHR producida por este péptido a dosis de 2 mg/kg, era superior a la que presentan péptidos como VPP y IPP, incluidos en productos comerciales (Calpis® y Evolus®) que presentan actividad antihipertensiva. El descenso fue de 21.87 mmHg la presión sistólica y de 28.5 mmHg para la presión diastólica a las 4 y 2 horas de la administración respectivamente (**Tabla 5**). Si comparamos estos valores con el captopril, resulta que la presión diastólica presentaba resultados muy similares en ambos casos. Podemos concluir que la secuencia LHLPLP

presenta una buena potencia inhibidora *in vivo*. Una secuencia muy similar LHLPLPL, que difiere solamente en el residuo Leucina terminal, quedando la Prolina en penúltima posición, presentaba un IC₅₀ casi 100 veces superior al anterior, lo que venía a confirmar la importancia del residuo del extremo C-terminal (Quiros et al., 2007). El efecto antihipertensivo cuando las secuencias LHLPLP, VLGPVRGPPF eran administradas a ratas SHR era debido seguramente al efecto *in vivo* de dichos péptidos en los animales. La secuencia LVYFPFGPIPNLSPQNIPP con un valor de IC₅₀ bajo, también tiene un residuo Prolina en el extremo C-terminal, pero es demasiado largo para ser absorbido. La digestión enzimática gastrointestinal podría generar el péptido IPP ya mencionado, y ser responsable del efecto antihipertensivo observado tras la administración oral (Miguel et al., 2006b).

Existe disparidad de opinión entre los autores en cuanto al valor de IC₅₀ adecuado para que un compuesto realmente ejerza su actividad antihipertensiva *in vivo*.

Diversos autores sugieren que la actividad inhibitoria *in vivo* que presentan los IECA procedentes de proteínas alimentarias es superior a la esperada a partir de su actividad *in vitro*. Este hecho se podría explicar por su mayor afinidad por los diferentes tejidos y su baja eliminación. Otra posibilidad es que la inhibición de la ECA no sea el único mecanismo de acción que explique el efecto antihipertensivo de la secuencia LHLPLP o las otras secuencias estudiadas. Algunos péptidos derivados de proteínas alimentarias y sus análogos sintéticos

se sabe que intervienen en el control de la hipertensión ejerciendo efectos vasorelajantes (Miguel et al., 2006b). No obstante, las dietas ricas en antioxidantes reducen significativamente la presión arterial en ratas SHR, y no podemos olvidarnos del efecto captador de ROS de estos péptidos, dado que ya se ha demostrado esta actividad en varios péptidos aislados de proteínas alimentarias (Miguel et al., 2006b).

A partir de estos estudios se deduce que:

- Valina-Prolina-Prolina e Isoleucina-Prolina-Prolina:
 - Poseen efecto antihipertensivo, dosis dependiente.
 - Específico de estado hipertensivo ya que no modifican la presión arterial en ratas normotensas WKY.
 - El efecto de la leche fermentada es algo superior al de cada péptido por separado.
 - La presión sistólica vuelve a los valores iniciales a las 24 h de la administración (Nakamura et al., 1995b).
- *Kéfir*:
 - Alta actividad IECA
 - Puede tener su explicación en la fermentación entre varias cepas bacterianas ácido lácticas y una levadura (Quiros et al., 2005).
 - Los resultados sugieren que los péptidos pequeños son mayoritariamente responsables de la actividad IECA en el *Kéfir* caprino (Quiros et al., 2005).

En resumen, tras investigaciones llevadas a cabo con el propósito de clarificar el efecto de los péptidos lácteos, se ha confirmado lo siguiente:

- Su efecto IECA
- El descenso de la presión sistólica en ratas SHR no mostrando efecto en normotensas
- Descenso de la presión sistólica en pacientes hipertensos y no el grupo placebo
- Son absorbidos sin degradación de enzimas digestivas
- Se detectó la presencia de dichos péptidos en aorta de ratas alimentadas con leche fermentada
- Ejercen un efecto dosis-dependiente
- Son considerados seguros dado que no afectan a normotensos ni a otros parámetros
- Se ha visto que VPP es transportado a través de la mono capa de células Caco-2, lo que sugiere que es absorbido directamente de intestino sin hidrólisis por parte de enzimas digestivas pudiendo llegar a aorta abdominal y ejercer su efecto antihipertensivo por medio de la inhibición de la ECA.

(Hata et al., 1996; Masuda et al., 1996; Miguel et al., 2006b; Mizuno et al., 2005; Nakamura et al., 1995a; Nakamura et al., 1995b; Quiros et al., 2007; Takano, 2002; Yamamoto and Takano, 1999).

En humanos, hay estudios de intervención que también confirman este efecto:

- Descenso de la presión sistólica, y un descenso moderado de la diastólica
- No se detectan cambios en otros parámetros
- Sin los efectos secundarios de los medicamentos IECA
- Sin efectos adversos en el metabolismo de lípidos
- Manteniéndose los niveles de descenso de la presión sistólica cuatro semanas después de acabar la ingesta, y en el caso de simultanear medicación antihipertensiva y péptidos IECA, estos últimos también ejercen su efecto
- El descenso de la presión sistólica es dosis dependiente (Hata et al., 1996; Mizuno et al., 2005).

La dosis de los péptidos IECA en la leche fermentada es relativamente baja comparada con la dosis de los fármacos inhibidores, no alcanzando el mismo efecto. Por ello, se podrían considerar como tratamiento tanto preventivo como en casos de hipertensión moderada, dado que la administración a largo plazo permite mantener los niveles de presión arterial bajos.

Tránsito intestinal versus DIANA en humanos

Algunos péptidos IECA muestran efectos antihipertensivos. No obstante, la capacidad inhibitoria de la actividad enzimática *in vitro* no siempre se corresponde con la actividad antihipertensiva *in vivo*. Algunos péptidos con una alta capacidad *in vitro* no tienen efecto sobre la presión arterial,

mientras que otros péptidos con poca actividad *in vitro* sí producen descenso de la presión arterial. Uno de los mecanismos que podrían ayudar a explicar este conflicto entre la actividad inhibitoria y el efecto antihipertensivo es la relación estructura actividad junto con el paso por el tracto digestivo y sus muchas enzimas.

Hay péptidos IECA, como son VPP e IPP, que son aislados directamente de productos alimentarios sin proteólisis *in vitro*, siendo por tanto péptidos activos en el momento de la ingesta. Para que éstos puedan ejercer su efecto antihipertensivo *in vivo*, al igual que otros muchos compuestos, tienen que pasar la barrera digestiva; no ser degradados por enzimas, ser absorbidos, y finalmente transportados hasta su órgano diana, y mostrar su efecto antihipertensivo. Yamamoto y Takano en su revisión del 99 y Masuda *et al.* trabajando con SHR confirman este hecho para estos dos péptidos, llegando a aorta donde inhiben la ECA (Masuda et al., 1996; Yamamoto and Takano, 1999). Por el contrario, otros, proceden de péptidos de mayor tamaño, inactivos, que a su paso por el digestivo son degradados y con ello activados, pero igualmente tendrán que ser capaces de llegar al órgano diana. Además, hay que tener en cuenta que existen diferencias en la estructura del aparato digestivo y la microflora de roedores y humanos. Más estudios serían adecuados para evaluar el impacto de la digestión gastrointestinal en la estabilidad y actividad, y en la disponibilidad de los péptidos (Miguel et al., 2006b).

Tabla 5: Péptidos lácteos con efecto IECA.

Procedencia		Péptido	IC ₅₀ μ M	Conc mg/kg	<i>In vivo</i>	Max efecto (h)	Δ PS mmHg	Δ PD mmHg	Cita
Calpis milk ^{ab}	sour	Val-Pro-Pro (VPP)	9	6 (5ml milk/kg)	SHR	4	32.1		(Nakamura et al., 1995a; Nakamura et al., 1995b)
Calpis milk ^{ab}	sour	Ile- Pro-Pro (IPP)	5	3 (5ml milk/kg)	SHR	8	28.3		(Nakamura et al., 1995a; Nakamura et al., 1995b)
Calpis milk ^{ab}	sour			5 ml/kg	SHR	6	21.8		(Nakamura et al., 1995a; Nakamura et al., 1995b)
Calpis milk ^{ab}	sour	VPP + IPP*		21.7 + 14.1 mg/L	SHR**	6 ²	26.4		(Masuda et al., 1996)
Calpis sour milk		Ile- Pro-Pro (IPP)	5	1		6	15.1		(Yamamoto and Takano, 1999)
Calpis sour milk		Val-Pro-Pro (VPP)	9	1.4		6	20.0		(Yamamoto and Takano, 1999)
Calpis milk ^{ab}	sour	Val-Pro-Pro (VPP)		0.6	SHR	4	30		(Takano, 2002)
Calpis milk ^{ab}	sour	Ile- Pro-Pro (IPP)		0.3	SHR	8	28		(Takano, 2002)
Calpis sour milk		YP	720	1		6	27.4		(Yamamoto and Takano, 1999)
α _{s1} -caseína bovina		FFVAPFPEVFGK	77	100		3	13.0		(Yamamoto and Takano, 1999)

Procedencia	Péptido	IC ₅₀ μM	Conc mg/kg	<i>In vivo</i>	Max efecto (h)	ΔPS mmHg	ΔPD mmHg	Cita
α _{s1} -caseína bovina	TTMPLW	16	100		3	13.6		(Yamamoto and Takano, 1999)
β-caseína bovina	AVPYPQR	15	100		3	10.0		(Yamamoto and Takano, 1999)
β-caseína bovina	KVLPVPQ	>1000	1		6	24.1		(Yamamoto and Takano, 1999)
β-caseína bovina	KVLPVP	5	1		6	32.2		(Yamamoto and Takano, 1999)
α _{s1} -caseína bovina	YKVPQL	22	1		6	12.5		(Yamamoto and Takano, 1999)
<i>Enterococcus faecalis</i>	LHLPLP	5.5	2		4	21.87	28.5	(Quiros et al., 2007)
<i>Enterococcus faecalis</i>	LHLPLP		3	SHR		25.3	29.5	(Miguel et al., 2006b)
<i>Enterococcus faecalis</i>	LHLPLPL	425						(Quiros et al., 2007)
<i>Enterococcus faecalis</i>	LHLPLPL	>130	10	SHR		7.7	9.4	(Miguel et al., 2006b)
<i>Enterococcus faecalis</i>	LVYPPFGPIPNSLPQNIPP	5.2						(Quiros et al., 2007)
<i>Enterococcus faecalis</i>	LVYPPFGPIPNSLPQNIPP		6	SHR		14.9	8.7	(Miguel et al., 2006b)
<i>Enterococcus faecalis</i>	VLGPVRGPPF	>130	10	SHR		16.2	21.64	(Miguel et al., 2006b)
<i>Enterococcus faecalis</i>	VRGPFPIIV	>130	10	SHR		16.05	9.19	(Miguel et al., 2006b)
KEFIR caprino	Ext acuoso	0.365 mg/ml						(Quiros et al., 2005)
	LEIVPK	>1000						(Quiros et al., 2005)
	DKIHPF	>1000						(Quiros et al., 2005)
	KIHPFAQAQ	132.6						(Quiros et al., 2005)

Procedencia	Péptido	IC ₅₀ μM	Conc mg/kg	<i>In vivo</i>	Max efecto (h)	ΔPS mmHg	ΔPD mmHg	Cita
	QLLKLK	342.4						(Quiros et al., 2005)
	LNVVGETVE	>1000						(Quiros et al., 2005)
	GVPKVKETMVPK	376.1						(Quiros et al., 2005)
	GVPKVKETMVPKH	223.2						(Quiros et al., 2005)
	IPAIN	432.6						(Quiros et al., 2005)
	GPFILV	424.0						(Quiros et al., 2005)
	KFAWPQ	177.1						(Quiros et al., 2005)
	TGPIPNSLPQ	>1000						(Quiros et al., 2005)
	YPF	>1000						(Quiros et al., 2005)
	HPFAQ	465.0						(Quiros et al., 2005)
	ENLLRF	82.4						(Quiros et al., 2005)
	PYVRYL	2.4						(Quiros et al., 2005)
	LVYPFTGPIP	27.9						(Quiros et al., 2005)
Suero Caprino	WLAHK							(Didelot et al., 2006)

Valores de IC₅₀ (μM) y efecto sobre presión sistólica (ΔPS) y diastólica (ΔPD); máximo efecto tras la ingesta (en horas), los estudios *in vivo* fueron en ratas hipertensas espontáneas (SHR).

¹: específico de estado de hipertensión

²: Sólo se mira a las X horas de la administración, no es efecto máx

*: Calpis sour milk, IPP y VPP juntos en las cantidades indicadas

** : IPP y VPP se detectan en Aorta

^a: Una sola dosis administrada

^b: No se detecta efecto en normotensas

KEFIR: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y la levadura *Kluyveromyces marxianus* var *fragillus* (*Torulla kefir*)

Péptidos de soja versus isoflavonas

La soja es una fuente importante de proteína en la alimentación de millones de personas. Quizá no de las más importantes en la cuenca mediterránea, pero sí en muchos países en desarrollo, junto con China y todo el sudeste Asiático. Se consume de formas muy diversas, las habas directamente, como licuado vegetal o "leche de soja", o procesada como *tofu*, *tempe*, *miso*, *shoyu*, etc. lo que ha llevado a investigar la presencia de IECA en péptidos de soja. No obstante, la elevada presencia de isoflavonas en los derivados proteicos de soja dificulta el esclarecimiento de las respectivas funciones. Rivas y colaboradores en un estudio randomizado, doble ciego, concluyen que el consumo de 500 ml de leche de soja dos veces al día durante tres meses, tiene un efecto hipotensor modesto pero significativo en pacientes con hipertensión esencial (Rivas et al., 2002). Queriendo establecer la función hipotensora de los péptidos de soja, llegan a la conclusión de que existe una correlación fuerte y significativa entre la excreción urinaria de genisteína (isoflavona presente en la leche de soja) y el descenso de la presión arterial, concretamente con la diastólica. A medida que aumenta la concentración de genisteína en orina disminuye la presión diastólica. Cuando comparan su estudio con otros similares, llegan a la conclusión de que sus resultados se deben a la alta concentración de isoflavonas (80 mg genisteína), la dosificación (dos veces al día) que ayudaba a

mantener los niveles altos de isoflavonas ya que la vida media de la genisteína en humanos es corta, y al alto contenido en proteínas. De modo que sugieren que las isoflavonas pueden mediar, al menos en parte, el efecto hipotensor de una dieta rica en soja. Por el contrario, Wu y colaboradores parten del hecho de que una dieta rica en proteína de soja tenga una mayor tendencia a descender la presión frente a una dieta rica en isoflavonas, indicando que las proteínas deben tener un papel relevante en dicho descenso. No obstante, quieren comprobar si la presencia de isoflavonas en la fracción peptídica IECA contribuye a su efecto reductor. Los resultados que obtienen indican que las isoflavonas no afectan a la presión arterial via IECA (Wu and Ding, 2001; Wu and Muir, 2008). Bloedon y colaboradores por su parte citan un descenso del 7% en presión sistólica y diastólica en mujeres sanas postmenopaúsicas que consumían un preparado con un 100% de isoflavonas no conjugadas aislada de soja (Bloedon et al., 2002). Sigue, por tanto, abierta la controversia de la contribución de las proteínas o isoflavonas de soja al descenso de la presión arterial.

Al trabajar con proteína de soja fermentada parece que las cosas están más claras. A partir del *tofu* (derivado proteico de soja fermentado con hongos *Monascus* o *Aspergillus*) se han aislado péptidos con capacidad IECA. En el extracto de *tofu* se detectó una actividad inhibitoria con un IC_{50} de 1.77 mg/ml. Se aislaron dos péptidos inhibidores Ile-Phe-Leu con un IC_{50} de 44.8 μ M y Trp-Leu, o WL, con un IC_{50} de 29.9 μ M (**Tabla 7**),

mostrando inhibición no competitiva. Para comprobar su estabilidad a su paso por el tracto digestivo, se sometieron a tratamiento con pepsina, tripsina y quimiotripsina; el péptido Trp-Leu mantenía su actividad incluso después de tratamientos sucesivos, por el contrario Ile-Phe-Leu se ve afectado por tripsina y quimiotripsina. Ahora bien, se sabe que ILe-Phe y Phe-Leu que forman parte del mismo, presentan valores de IC_{50} de 930 y 16 μM respectivamente. Por tanto podrían ejercer su actividad hasta casi ser degradados completamente. Dado el tamaño que presentan los dos péptidos encontrados en *tofu*, es de esperar que sean bien absorbidos y transportados (Kuba et al., 2003). En otro trabajo sobre *tofu*, con fermentación únicamente con *Monascus*, detectan cuatro péptidos inhibidores, de los cuales tres de ellos se citan por primera vez (LAIPVNKP, LPHF y SPYP) además de otro ya citado anteriormente en la bibliografía WL (**Tabla 7**). Trabajan con ECA de cerdo, por ser éste una especie más próxima al humano. Puesto que habitualmente se trabaja con ECA de conejo, la diferencia de especificidad que pueda existir entre enzima y sustrato podría explicar los valores algo superiores de IC_{50} que detectan. Así, WL y LAIPVNKP presentaban unos valores de IC_{50} 65 y 70 μM , respectivamente, frente a los 30 y 35 μM que citan otros autores. Dado que el extremo C-terminal es importante a la hora de establecer la unión péptido inhibidor, la terminación en Prolina y Fenilalanina de los péptidos confirmaría su fuerte efecto inhibidor. Los péptidos KP, IKP y LKP cuyo extremo C-

terminal es el mismo de LAIPVNKP han sido citados como fuertes inhibidores con valores de IC_{50} de 22 μ M, 1.7 μ M y 1.6 μ M, respectivamente.

Tabla 6: Estabilidad tras digestión enzimática de péptidos extraídos de tofu tras fermentación con *Monascus*.

Péptido	IC_{50} μ M	
	Antes	Después
SPYP	850	60
LPHF	670	610
WL	65	77
LAIPVNKP	70	376

Al ser sometidos a digestión enzimática, se ve modificada su capacidad inhibitoria (Kuba et al., 2003).

Al mirar la estabilidad de los mismos frente a proteasas digestivas *in vitro*, se vio que LPHF y WL mantenían su actividad, por el contrario, LAIPVNKP perdía actividad, y SPYP ganaba capacidad inhibitoria. Los extremos N- y C-terminal de LAIPVNKP debían ser degradados por la tripsina (**Tabla 6**). La pérdida de la Prolina podría explicar la reducción de la actividad. SPYP, debido a la acción de la tripsina probablemente sea degradado a SPY y P, quedando la Y como extremo C-terminal, y siendo quizá la explicación de ese aumento de actividad (Kuba et al., 2005).

Péptidos de huevo

El primer péptido que se aisló fue un octapéptido antihipertensivo y relajante vascular, que tenía la siguiente secuencia FRADHPFL, que corresponde al fragmento 358-365 de la ovoalbúmina, proteína mayoritaria de la clara de huevo (**Tabla 7**). Fue denominado ovokinina. Mostró efecto en ratas SHR a dosis altas, y se veía potenciado su efecto al ser emulsionado en yema de huevo. Se postuló que los fosfolípidos de la yema aumentaban la disponibilidad oral de la ovokinina, porque mejoraban su absorción intestinal, y le protegían de la digestión por parte de las peptidasas intestinales.

Fujita y colaboradores (Fujita et al., 1995) comprobaron que los hidrolizados de ovoalbúmina con pepsina y termolisina presentaban actividad inhibitoria de la ECA, con valores de IC_{50} de 45 $\mu\text{g/ml}$ y 83 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A partir del hidrolizado con pepsina se aislaron seis péptidos con valores de IC_{50} entre 0.4 μM y 15 μM , pero sólo Leu-Trp mostró actividad en ratas SHR.

El segundo péptido que se aisló fue un hexapéptido que se caracterizó como el fragmento 2-7 de la ovokinina, RADHPF (**Tabla 7**). En este caso sus efectos son vía activación de receptores de bradikinina y mediación de NO (Matoba et al., 1999).

Miguel y colaboradores, llegan a la conclusión de que la hidrólisis de las proteínas de la clara de huevo con diferentes

enzimas de origen digestivo, proporciona hidrolizados con elevada actividad IECA. Los resultados más potentes se obtuvieron tras tratar la proteína con pepsina durante tres horas, con un valor de IC_{50} de 55 $\mu\text{g/ml}$. Se identificaron varios péptidos que correspondían con las secuencias YAEERYPIL, RADHPFL e IVF, cuyos valores de IC_{50} fueron 4.7 μM , 6.2 μM y 33.11 μM , respectivamente. Produjeron una disminución clara de la presión sistólica y diastólica en SHR. Este hidrolizado era capaz de atenuar el desarrollo de la hipertensión cuando era administrado a ratas desde el destete (Miguel et al., 2004). Al estudiar los efectos de una digestión gastrointestinal se observó un descenso de actividad, indicando una posible hidrólisis. Los péptidos resultantes fueron YAEER, YPI y RADHP. Estos dos últimos producían un descenso significativo de la presión arterial tras dos horas de administración. Es posible que RADHP sea el producto final activo tras la digestión de las secuencias FRADHPFL (ovokinina) y RADHPF (ovokinina 2-7) (Miguel et al., 2006a).

Tabla 7 :Valores de IC₅₀ de péptidos de soja, sardina, ternera y huevo.

	Compuesto	IC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM Tras digestión enz	Tipo Inhibición	ΔPS mmHg	ΔPD mmHg	Cita
Soja fermentada	Ile-Phe-Leu	44.8					(Kuba et al., 2003)
	Trp-Leu	22.9					(Kuba et al., 2003)
	Ile-Phe	930					(Kuba et al., 2003)
	Phe-Leu	16					(Kuba et al., 2003)
	LAIPVNKP	70	376				(Kuba et al., 2005)
	LPHF	670	610				(Kuba et al., 2005)
	SPYP	850	60				(Kuba et al., 2005)
	WL	65	77				(Kuba et al., 2005)
Sardina	Met-Phe	44.7		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Arg-Tyr	51		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Met-Tyr	193		NO Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Leu-Tyr	38.5		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Tyr-Leu	82		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Ile-Tyr	10.5		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Val -Phe	43.7		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Lys-Trp	1.63		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Gly-Arg-Pro	20.0		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Arg-Phe-His	330		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Als-Lys-Lys	3.13		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Arg-Val-Tyr	205.6		Comp			(Matsufuji et al., 1994)
	Gly-Trp-Ala-Pro	3.86		Comp			(Matsufuji et al., 1994)

	Compuesto	IC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM Tras digestión enz	Tipo Inhibición	ΔPS mmHg	ΔPD mmHg	Cita
Tenera	VLAQYK	30%					(Jang and Lee, 2005)
Huevo	FRADHPFL	6.3					(Fujita et al., 1995)
	LW						(Fujita et al., 1995)
	RADHPF						(Miguel et al., 2005)
	YAEERYPIL ^a	4.7		D d	31.6	47.3	(Miguel et al., 2005; Miguel et al., 2004)
	RADHPFL ^a	6.2		D d	34.1	24.3	(Miguel et al., 2005; Miguel et al., 2004)
	IVF	33.11		D d	31.7	32.2	(Miguel et al., 2005; Miguel et al., 2004)
	YAEER						(Miguel et al., 2006b)
	YPI						(Miguel et al., 2006b)
	RADHP						(Miguel et al., 2006b)

Dd: Dosis dependiente

Comp: Inhibición Competitiva

No Comp: Inhibición No competitiva

a: susceptible de degradación proteolítica

ΔPS: Variación de la presión sistólica.

ΔPD: Variación de la presión diastólica

Actividad de procianidinas, flavonoides y compuestos fenólicos de la dieta sobre la ECA

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos están presentes ampliamente en la dieta humana, principalmente en alimentos y bebidas derivados de frutas y verduras. Se ha demostrado que ciertos alimentos ricos en polifenoles inhiben la actividad de la ECA, tanto *in vivo* como *in vitro*, explicando en parte la observación de reducción de presión arterial asociada a la ingesta de alimentos ricos en flavonoides como el chocolate (Actis-Goretta et al., 2006; Grassi et al., 2005; Ottaviani et al., 2006; Taubert et al., 2003), té (Basu and Lucas, 2007; Negishi et al., 2004), vino (Dell'Agli et al., 2004; Diebolt et al., 2001), zumo de granada (Actis-Goretta et al., 2006; Actis-Goretta et al., 2003; Aviram and Dornfeld, 2001). Este hallazgo abre la posibilidad de que el consumo de alimentos ricos en polifenoles en la dieta pueda mimetizar a los inhibidores sintéticos de la ECA, brindando los efectos positivos pero no los adversos (Actis-Goretta et al., 2006; Actis-Goretta et al., 2003). Los mecanismos a través de los cuales los flavonoides modulan la función y presión arterial podrían estar asociados a la acción del NO. A pesar de que no se han identificado totalmente los sucesos iniciales que llevan al incremento de la producción de NO y reducción de la presión arterial, parece que la regulación del sistema renina-angiotensina en las células endoteliales podría estar

involucrado en dicho control (de Cavanagh et al., 2004; Diebolt et al., 2001).

Se han llevado a cabo extensos estudios sobre los flavonoides como agentes antioxidantes durante los últimos años (Kris-Etherton et al., 2002), pero no tantos que expliquen la relación flavonoides-presión arterial. Las procianidinas son un grupo de flavonoides que están compuestos por unidades de flavanol, como la catequina y epicatequina, fundamentalmente presentes en cacao, vino tinto, arándanos, manzana y otras verduras (Hammerstone et al., 2000).

Tras el consumo habitual de una dieta rica en procianinas y 3-flavanoles durante 14 días, se vió reducida la presión arterial de forma significativa en ancianos (Taubert et al., 2003). Al estudiar el efecto de inhibición Actis-Goretta y colaboradores (Actis-Goretta et al., 2003) determinaron que los 3-flavanoles y procianidinas tienen un efecto inhibidor de la actividad ECA compitiendo con el sustrato por los sitios activos de la enzima. En estudios *in vitro* con ECA purificada que caracteriza la relación entre el tamaño de las procianidinas (monómeros, dímeros, ...) y su habilidad para inhibir la actividad de la ECA, se ha observado que la catequina y epicatequina (monómeros) son inhibidores más débiles, mostrando efectos de inhibición a concentraciones superiores a 100 μM , produciéndose un mayor efecto inhibitorio al aumentar el número de subunidades.

Pudiendo establecerse tres niveles de IC_{50} :

- En el rango mM para 3-flavanoles monoméricos
- En el rango 100 μM para dímeros y trímeros

- En el rango 10 μM para las procianidinas mayores,
No obstante, estas concentraciones deben ser tomadas con precaución, dado que se había trabajado *in vitro* en condiciones no fisiológicas (Actis-Goretta et al., 2003).

En plasma humano, se ha determinado la presencia de catequina, epicatequina y dímeros a baja concentración micromolar (Holt et al., 2002), y existen publicaciones sobre concentraciones de monómeros y dímeros, por lo que esta presencia en plasma podría explicar su efecto sobre la ECA vascular endotelial; sin embargo no hay publicaciones sobre la presencia de procianidinas mayores en tejidos.

Actis-Goretta y colaboradores han mostrado que los inhibidores de ECA pueden modular las defensas antioxidantes y regular la producción de NO mitocondrial, apoyando el concepto de que la inhibición de ECA pueda explicar parcialmente los efectos de los flavonoides en la salud en general (de Cavanagh et al., 2003), resaltando el papel de los 3-flavanoles y procianidinas en la modulación del estrés oxidativo, función vascular y enfermedad cardiovascular (Actis-Goretta et al., 2003).

La administración de compuestos fenólicos del vino tinto en agua, se vio que prevenía de forma eficaz la hipertensión inducida por angiotensina II en ratas (Sarr et al., 2006). Estos extractos ricos en compuestos fenólicos no sólo retrasan de forma eficaz el desarrollo de la hipertensión, sino que también normalizan la presión arterial una vez se ha establecido la hipertensión tanto en animales como en humanos. El efecto

protector podría explicarse en parte, por las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos, pero también puede ser debido a cambios en el patrón de expresión de enzimas endógenas pro-oxidantes en la pared arterial.

Plantas de uso tradicional antihipertensivo

Dentro de la cultura tradicional de muchos países, se han utilizado plantas como remedios medicinales, siendo el efecto hipotensor o antihipertensivo uno de ellos.

Plantas brasileñas, Isla Reunión e India

Braga y colaboradores (Braga et al., 2007) trabajando fundamentalmente con plantas brasileñas, que han sido utilizadas en la medicina popular como diuréticas o como antihipertensivas, destacan lo siguiente. A partir de *Calophyllum brasiliense* detectan algunas **xantonas** y otros **polifenoles** que cumplen los requisitos como IECA, pudiendo ser los componentes activos de dicha especie. En el género *Combretum* se han aislado **taninos, saponinas, triterpenos** y **flavonoides**, que han sido descritos como inhibidores efectivos de ECA. El extracto acuoso de *Terminalia catappa*, utilizada en la Isla de la Reunión como antihipertensivo, produce un 80% de inhibición de la ECA a 0.33 mg/ml. Estudios fitoquímicos indican que estas especies son ricas en **polifenoles**, incluyendo **flavonoides** y quercetina. El extracto de hojas de *Phoenix sylvestris*, utilizada popularmente en india

como diurética, presenta un 48% de inhibición ensayado a 0.33 mg/ml. Tras eliminar los **taninos** quedaba tan sólo un 8% de poder inhibitorio, lo que sugiere la participación de dichos compuestos.

Plantas chinas

Buscando la explicación del uso tradicional antihipertensivo de algunas de las plantas utilizadas en China, se han aislado **taninos (cafeoilquinatos, flavan-3-ol y galotaninos)** que presentan un efecto claramente IECA. De los 18 taninos aislados, 9 tenían valores de IC₅₀ inferiores a 200 µM (**Tabla 8**).

Tabla 8: Valores de IC₅₀ de taninos extraídos de plantas medicinales chinas.

Clase de tanino	IC ₅₀ µM
Cafeoilquinatos	
Metil-3,5-di-O-cafeoilquinato	82.9
Metil-3,4-di-O-cafeoilquinato	169.6
Flavan-3-ol	
Galocatequin	195.9
Galocatequin-3-O-galato	113.0
Epicatequin-3-O-galato	18.3
Epigalocatequin-3-O-galato	37.4
Epigalocatequin-3-O-metilgalato	26.6
Galotaninos	
1,2,3,6-Tetra-O-galloil-β-D-glucosa	101.4
1,2,3,4,6-Penta-O-galloil-β-D-glucosa	73.1

Todos presentan un IC₅₀ ≤ 200 µM (Liu et al., 2004).

Al hacer estudios de actividad *in vitro*, se vio que cuatro de ellos presentaban una inhibición no competitiva, es decir, tanto el sustrato como el inhibidor (tanino) se unen a la enzima simultáneamente y de forma reversible. Dos presentaban un tipo de unión no específica (inhibían también la actividad de la tripsina y la quimiotripsina), mientras que otro mostraba unión específica.

Dado que la ECA es una metaloproteinasa dependiente de Zn^{2+} , y que los compuestos quelantes de metales no específicos pueden presentar un efecto IECA se probó el efecto de un suplemento de Zn^{2+} en el medio de reacción, con el fin de comprobar si disminuía el efecto inhibitorio. Se observó una disminución de un 30% de la actividad inhibitoria en los dos cafeoilquinatos, lo que mostraba que el efecto era debido al menos en parte al secuestro de Zn^{2+} por parte de los taninos.

Tabla 9: Actividad IECA de flavonoides de hoja de *Ailanthus excelsa*

Compuesto	IC ₅₀ μM
Apigenina	280±3.2
Luteolina	290±2.9
Kamferol-3-O-α-arabinopiranosido	320±4.1
Kamferol-3-O-β-galactopiranosido	260±3.0
Quercetín-3-O-α-arabinopiranosido	310±2.2
Luteolín-7-O-β-glucopiranosido	280±3.4

IC₅₀ media ±SEM (n=3) (Oh et al., 2004)

Al comprobar su efecto en ratas SHR, dos de ellos, 1,2,3,6-Tetra-O-galloil- β -D-glucosa (galotanino) y Epigallocatequin-3-O-metilgalato (flavan-3-ol), a las dosis de 10, 20 y 40 mg/kg de peso del animal producían un descenso de la presión arterial de $27,2 \pm 4$, $45,5 \pm 5$ y 51 ± 5 mmHg y $37,5 \pm 5$, $46,3 \pm 5$ y $52,5 \pm 6$ mmHg, respectivamente. Mostraban un efecto reductor de la presión superior al captopril (9.9 ± 2 mmHg, IC₅₀ de $0.02 \mu\text{M}$), aunque *in vitro* su valor de IC₅₀ fuera superior, por lo que concluyen que en el efecto hipotensor deben actuar otros mecanismos que apoyen el descenso tan marcado de la presión arterial (Liu et al., 2003; Loizzo et al., 2007).

En conclusión, un número de taninos investigado en este trabajo produce una inhibición no competitiva de la ECA al secuestrar el metal (Zn^{2+}) que actúa como cofactor de la enzima. Otros compuestos presentan una inhibición no específica dado que también inhiben tripsina y quimiotripsina. Por el contrario, otros parecen no producir inhibición por ninguno de los métodos probados. Lo cual sugiere una posible inhibición específica de la ECA, aunque muestren una inhibición no competitiva, lo que implica un mecanismo que no incluye la competición activa por el sitio activo de la enzima (Liu et al., 2003).

Ailanthus excelsa* y *Sedum sarmentosum

Loizzo y colaboradores, haciendo un *screening* de la capacidad inhibitoria del extracto metabólico de hojas de *Ailanthus excelsa* obtuvieron una inhibición del 53% a una concentración de 330 µg/ml. A partir de este extracto aislaron **flavonoides** que inhiben la actividad de la ECA de manera dosis dependiente (**Tabla 9**), siendo el más activo kamferol-3-O-β-galactopiranosido con IC₅₀ de 260 µM. La **luteolina** presentaba un IC₅₀ de 290 µM (**Tabla 9**), la introducción de una estructura glucopiranosido variaba un poco su actividad (IC₅₀ 280 µM) mientras que la **apigenina** mostraba un IC₅₀ de 280 µM (Loizzo et al., 2007).

Tabla 10: Actividad IECA de flavonoides de *Sedum sarmentosum*

Compuestos	IC ₅₀ µM
1	158.9±11.1
2	351.6±3.9
3	408.9±4.6
4	708.8±23.1
5	392.8±13.4

IC₅₀ media±SEM (n=3) (Oh et al., 2004)

Estos datos coincidían con los publicados por el grupo de Oh, que trabajando con *Sedum sarmentosum*, citan la actividad IECA (dosis dependiente) de cinco **flavonoides** (**Tabla 10**),

con valores de IC₅₀ entre 158 y 708 µM. Presentando una estructura química muy similar, la actividad del compuesto 1 duplicaba la del 2, siendo la única diferencia la sustitución de un grupo -OH del C6'''' por un H en el compuesto 2 (**Tabla 11**), lo que sugiere la importancia del grupo -OH (Oh et al., 2004).

Pasiflora edulis

En el extracto de hojas de *Pasiflora edulis* la **luteolina (flavonoide)** es uno de los polifenoles más abundantes, por lo que se midió el efecto antihipertensivo de una sola administración oral de luteolina en ratas SHR. Cuando se administraban 50 mg/kg de peso del animal se observó un descenso significativo de la presión sistólica a partir de la hora de administración, a las 7 h los valores habían vuelto a los iniciales (Ichimura et al., 2006).

Efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la presión arterial

Disponemos de pocos datos sobre los secoiridoides y su efecto sobre la ECA, pero teniendo en cuenta los datos de los compuestos hasta ahora citados y las similitudes estructurales con algunos de ellos, comprobamos si los compuestos fenólicos del AOV ejercen algún tipo de efecto sobre la ECA.

De *Ligustrum vulgare*, otro miembro de la familia *Oleaceae*, sí tenemos datos más concretos. Los principales compuestos que

se extraen son **flavonoides, triterpenos y secoiridoides**. El extracto acuoso de sus hojas, presenta una actividad IECA con un IC_{50} de 100 $\mu\text{g/ml}$. Las fracciones activas del extracto contenían ligstrósido aglicona y oleuropeína aglicona, y según los propios autores, esta es la primera cita en la que secoiridoides aglicona muestran efecto inhibitor frente al compuesto glicosilado; con valores de IC_{50} de 25 y 20 μM , respectivamente (Kiss et al., 2008).

Estudios de intervención

A partir de estudios de intervención, podemos obtener otro tipo de datos. Ruíz-Gutierrez y sus colaboradores compararon el efecto de dos dietas similares en su contenido en MUFA (AOV y aceite de girasol con elevado contenido en ácido oleico) en mujeres hipertensas y confirmaron que sólo aquéllos que siguieron la dieta rica en aceite de oliva mostraron una reducción significativa en la presión arterial, sugiriendo el papel importante de los compuestos fenólicos en la misma (Ruiz-Gutierrez et al., 1996).

Respaldando esta hipótesis, Fitó y colaboradores citan una reducción de la presión sistólica en pacientes hipertensos estables con enfermedad coronaria tras el consumo de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos, en comparación con aceite con bajo contenido en compuestos fenólicos (Fitó et al., 2005). Este hecho es particularmente importante en aquellos

que mostraban una presión sistólica ≥ 140 mmHg al inicio del estudio. También se observó un descenso en la LDL circulante y peróxidos lipídicos en relación al contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva.

Los triterpenoides del aceite de oliva, ácido oleanólico y eritrodiol, causaron vasorelajación dependiente del endotelio en la aorta de rata, asociada a la producción endotelial de NO (Rodríguez-Rodríguez et al., 2004).

Una importante causa de disfunción endotelial en la hipertensión esencial es una reducida disponibilidad de NO. El estrés oxidativo, como hemos visto anteriormente, reduce la disponibilidad de NO (Guzik et al., 2002) y se ha publicado la inhibición de la expresión de la NO sintasa por la LDL oxidada (Dulak et al., 1999). El efecto antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva podría ser responsable del efecto protector que se observa sobre la presión arterial, sin embargo, la reducida concentración de los mismos en plasma, lleva a considerar otros posibles mecanismos indirectos de acción de los compuestos que conduzcan a la reducción de presión arterial.

El efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre el control de la vasodilatación endotelial ha sido recientemente publicado. Ruano y colaboradores (Ruano et al., 2005) demostraron que la ingesta de una dieta con aceite de oliva con elevado contenido en compuestos fenólicos mejoró la vasodilatación dependiente del endotelio durante el estado postprandial más que cuando la dieta contenía un aceite de

oliva similar pero de bajo contenido en compuestos fenólicos (Ruano et al., 2005). Se observó una mejoría en la hiperemia reactiva a la isquemia, así como una reducción del estrés oxidativo y metabolitos del NO, sugiriendo una relación entre ambos. Por lo tanto, los beneficios del aceite de oliva y sus compuestos fenólicos sobre la presión arterial podrían estar mediados, en parte, por el efecto protector de la función endotelial vascular.

Papamichael y colaboradores (Papamichael et al., 2008) han publicado recientemente un estudio aleatorio, controlado y cruzado, que valora el efecto postprandial de la ingesta de vino y aceite de oliva en diferentes combinaciones sobre la presión arterial. Todas las combinaciones provocaron una reducción significativa en los valores de presión arterial. Los autores concluyen que el consumo combinado de vino y aceite de oliva, en cantidades adecuadas, ejerce un efecto positivo sobre la presión arterial.

Tabla 11: Valores de inhibición de la ECA de compuestos fenólicos procedentes de plantas con uso tradicional antihipertensivo.

Compuesto	IC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µM <i>in vitro</i>	INH ACE	Conc mg/kg	Efecto max (h)	ΔPS mmHg	Cita	Procedencia del compuesto
Apigenina		280±3.2	Dd				(Loizzo et al., 2007)	<i>Ailanthus excelsa</i> Roxb
Luteolina		290±2.9	Dd				(Loizzo et al., 2007)	<i>Ailanthus excelsa</i> Roxb
Kamferol-3-O-α-arabinopiranosido		320±4.1	Dd				(Loizzo et al., 2007)	<i>Ailanthus excelsa</i> Roxb
Kamferol-3-O-β-arabinopiranosido		260±3.0	Dd				(Loizzo et al., 2007)	<i>Ailanthus excelsa</i> Roxb
Quercetin-3-O-α-arabinopiranosido		310±2.2	Dd				(Loizzo et al., 2007)	<i>Ailanthus excelsa</i> Roxb
Luteolin-7-O-β-arabinopiranosido		280±3.4	Dd				(Loizzo et al., 2007)	<i>Ailanthus excelsa</i> Roxb
Ext H ₂ O de hoja	100		48±6				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Extr H ₂ O flores	200		30±3				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Extr H ₂ O fruto	400		18±4				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Tirosol			No INH				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Hidroxitirosol	>100		28±2				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Oleuropeína		--					(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Oleuropeína aglicona	8	20 µM	95±3				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Ligstrósido aglicona	10	25µM	96±2				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Ligstrósido		--					(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Lueolina-7-glucósido	>100		25±5				(Kiss et al., 2008)	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
Luteolina	50				7	20	(Ichimura et al., 2006)	<i>Pasiflora edulis</i> rind.

Compuesto	IC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µM <i>in vitro</i>	INH ACE	Conc mg/kg	Efecto max (h)	ΔPS mmHg	Cita	Procedencia del compuesto
Ácido ferúlico	18%			9.5	2	34	(Ardiansyah et al., 2008)	
Ácido ferúlico				3	2	13	(Ardiansyah et al., 2008)	
Ácido ferúlico				30	2	19	(Ardiansyah et al., 2008)	
Cafeoilquinatos								
Metil-3,5-di-O- cafeoilquinato		82,9					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
Metil-3,4-di-O- cafeoilquinato		169,9					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
Flavan-3-ol								
Galocatequina		195,9					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
Catequin-3-O- galato		113,0					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
Epicatequin-3-O- galato		18,3					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
Epigalocatequin- 3-O-galato		37,4					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
Epigalocatequin- 3-O-metilgalato		26,6					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
Galotaninos								
1,2,3,6-Tetra-O- galloil-β-D- glucosa		101,4					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas
1,2,3,4,6-Penta- O-galloil-β-D- glucosa		73,1					(Liu et al., 2003)	Plantas tradicionales chinas

Compuesto	IC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µM <i>in vitro</i>	INH ACE	Conc mg/kg	Efecto max (h)	ΔPS mmHg	Cita	Procedencia del compuesto
Quercetin--3-O- α-(6''''- cafeoilglucosil- 1,2-ramnosido)		158.9±11.1	Dd				(Oh et al., 2004)	<i>Sedum sarmentosum</i>
Quercetin--3-O- α-(6''''-p- cumarilglucosil- β-1,2-ramnosido)		351.6±3.9	Dd				(Oh et al., 2004)	<i>Sedum sarmentosum</i>
Isoramnetin-3-β- glucopiranosido		408.9±4.6	Dd				(Oh et al., 2004)	<i>Sedum sarmentosum</i>
Quercetin—3-β- glucoporanosido		708.8±23.1	Dd				(Oh et al., 2004)	<i>Sedum sarmentosum</i>
Kampferol-3-α- arabinopiranosido		392.8±13.4	Dd				(Oh et al., 2004)	<i>Sedum sarmentosum</i>
Leucosceptósido A		423.7±18.8					(Kang et al., 2003)	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Martinósido		524.4±28.1					(Kang et al., 2003)	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Acetósido isómero		376.0±15.6					(Kang et al., 2003)	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Isomartinósido		505.9±26.7					(Kang et al., 2003)	<i>Clerodendron trichotomum</i>

Inhibición Dosis dependiente (Dd), o no inhibe (No INH); efecto máximo detectado (horas), ΔPS: Variación de la presión sistólica



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Partimos de la hipótesis de que un aceite enriquecido en compuestos fenólicos elegidos por su actividad protectora de la oxidación puede reducir la presión arterial y obtener más efectos beneficiosos que con el consumo del AOV en su estado natural.

OBJETIVOS

El objetivo global del proyecto es optimizar la composición del AOV a partir de la elección de componentes de la fracción fenólica del AOV con demostrada actividad biológica y comprobar los efectos hipotensores y cardioprotectores en el hombre.

Planteamos dos objetivos:

1. Evaluar la resistencia a la oxidación de la LDL producida por los compuestos fenólicos del AOV y la posible cooperación antioxidante entre ellos, *in vitro*.
2. Estudiar la actividad inhibidora de la ECA producida por los compuestos fenólicos del AOV con objeto de dilucidar los posibles mecanismos de los fenoles sobre la presión arterial, *in vitro*.



MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

FORMACIÓN DE DIENOS CONJUGADOS

Fundamento

La formación de dienos conjugados es uno de los episodios más tempranos de la peroxidación lipídica. Al abstraerse el átomo de hidrógeno del ácido graso debido al ataque del radical libre, se produce una reestructuración de los dobles enlaces de la cadena carbonada. Cuando los dobles enlaces están separados por dos o más enlaces sencillos no interaccionan entre ellos y se denominan enlaces dobles aislados (-C=C-). Sin embargo, cuando los dobles enlaces están separados tan sólo por un enlace sencillo interaccionan entre sí y se denominan dobles enlaces conjugados o dienos (-C=C-C=C-). Debido a la interacción entre los dobles enlaces, los sistemas con dobles enlaces conjugados son más estables que los sistemas con dobles enlaces aislados.

Esta reestructuración de la cadena carbonada provoca un incremento de la absorbancia a 234 nm fácilmente detectable, muy útil para el control de la oxidación de las lipoproteínas aisladas, ya que permite seguir de una manera continua la cinética de oxidación inducida por un agente oxidante, por ejemplo un metal de transición como el cobre (Millán Nuñez, 2005). En 1989 Esterbauer (Esterbauer et al., 1989) definió las características de la cinética de oxidación de la LDL aislada

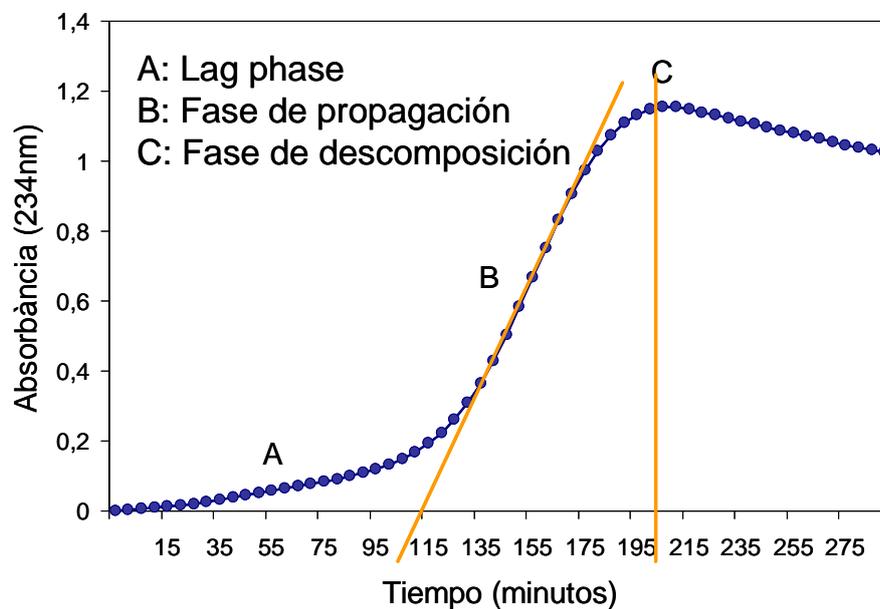
inducida mediante la incubación con sulfato de cobre. Desde entonces esta metodología se ha ido utilizando con mayor frecuencia para la determinación de la susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas, principalmente la LDL. Nosotros utilizaremos este mismo método, mejorado por Kleinveld (Kleinveld et al., 1992), en que se determina la susceptibilidad de las LDL a oxidarse. Se basa en medir la absorbancia a 234 nm a lo largo de un tiempo determinado para describir la cinética de formación de dienos conjugados de la LDL en presencia o no de los compuestos a analizar.

La cronología de la cinética de oxidación de la LDL inducida por sulfato de cobre puede dividirse en tres fases consecutivas: fase de latencia o *Lag Phase*, fase de propagación y fase de descomposición (**Figura 6**).

Estas tres fases resultan de la oxidación de los PUFAs a peróxidos lipídicos cuando los dobles enlaces carbono-carbono (-C=C-) se convierten en dobles enlaces conjugados o dienos (-C=C-C=C-) con un máximo de absorción a 234 nm.

Durante la *Lag Phase*, la LDL se ve progresivamente deplecionada de sus moléculas antioxidantes primero el ubiquinol-10, luego el α -tocoferol y finalmente los carotenos. Durante este período la peroxidación lipídica es mínima, de modo que cuanto más dure esta fase, menos susceptible a la oxidación será la partícula lipoproteíca. Según este método, la *Lag Phase* se define como el tiempo en minutos que tarda una LDL en comenzar a oxidarse, y dependerá por tanto, de la concentración de antioxidantes que tenga.

Figura 6: Representación gráfica de la cinética de oxidación de la LDL inducida por sulfato de cobre, formación de dienos conjugados



Lag phase o fase de latencia, **A**. Punto de intersección entre B y el eje de abscisas, tiempo en minutos que tarda una LDL en comenzar a oxidarse (minutos).

Fase de propagación, B pendiente de la recta que describe la fase de propagación x Factor ($\mu\text{mol dienos}/\text{min} \cdot \text{g prote\u00edna}$).

Fase de descomposición, C.

Una vez consumidos los antioxidantes empieza la fase de propagación, es decir, empieza la peroxidación lipídica y se van oxidando todos los PUFAs presentes en la part\u00edcula lipoproteica hasta que se acaban; en ese momento, empieza la

fase de descomposición, con la formación de productos finales más estables como los aldehídos. Esta formación de dienos conjugados en el tiempo, se refleja gráficamente como un perfil temporal de formación de los peróxidos lipídicos (**Figura 6**).

La determinación de la *Lag Phase* es un método objetivo para cuantificar la susceptibilidad de la LDL a la oxidación así como para averiguar el efecto de posibles pro-oxidantes o antioxidantes (Esterbauer et al., 1989).

Con objeto de valorar dicha capacidad antioxidante, se ha estudiado la resistencia a la oxidación de la LDL producida por los compuestos fenólicos del AOV, medida mediante la *Lag Phase* de la formación de dienos conjugados.

El estudio de los compuestos fenólicos se dividió en tres etapas bien diferenciadas:

- a) Estudio *Dosis-efecto*, en la que se trabajó con 19 compuestos fenólicos de manera individual, a concentraciones crecientes con el objetivo de determinar la mínima concentración que produce la inhibición de la *Lag Phase* utilizando curvas dosis efecto de la inhibición de la oxidación de la LDL mediada por cobre; así como comprobar si el aumento de concentración producía una mayor respuesta. El rango de concentración de los compuestos fue de 0-20 μM , con el α -tocoferol a 0.5 μM como control.

- b) Estudio a *concentración fija* a la que todos ellos eran capaces de actuar, determinada en el paso anterior (0.5 μM); se detectaron 5 compuestos con mayor capacidad antioxidante. Se utilizó como referencia la LDL sin fenoles, y el α -tocoferol a 0.5 μM como antioxidante control.
- c) *Sinergias*: se trabajó con los compuestos fenólicos observados con mayor poder antioxidante, se ensayaron a concentraciones más fisiológicas (0.2 μM /compuesto), tanto individualmente como combinaciones de 4 ó 5 compuestos. Con la finalidad de averiguar si existía un efecto sinérgico.

Esta cinética de oxidación de la LDL se determinó por monitorización del cambio de absorbancia a 234 nm a 30°C. Las dos primeras etapas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Kontron UVICON 922 equipado con bandeja multiposición de 12 cubetas, que permite medir diez muestras simultáneamente, quedando las otras dos posiciones ocupadas por blancos. La absorbancia se midió cada 3 minutos durante 5 horas. En la tercera etapa, cambiamos a un espectrofotómetro más sensible, que además nos permitió rebajar el volumen de reacción necesario para llevar a cabo la formación de dienos conjugados de la LDL inducida por cobre, se redujo de 2.5 ml a 200 μl y aumentamos el número de muestras analizadas simultáneamente a 96. Cambiamos a un

espectrofotómetro de placa, Lector Multidetector de Placas Synergy HT, manteniendo las mismas condiciones de trabajo.

Reactivos

- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Fluka Co. (Buchs, Switzerland)
- BSA: albúmina de suero bovino como estandar, Sigma-Aldrich (Madrid, Spain)
- Compuestos fenólicos comerciales, ver **Tabla 13**
- Compuestos fenólicos extraídos del AOV, ver **Tabla 12**
- NaCl, Panreac (Barcelona, Spain)
- $\text{HNa}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Fluka Co. (Buchs, Switzerland)
- $\text{H}_2\text{NaPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Fluka Co. (Buchs, Switzerland)
- Bradford, Bio-Rad (Barcelona, Spain)
- Metanol, Panreac (Barcelona, Spain)

Soluciones de trabajo

- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, solución 10 mM, preparación al momento.
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, solución 30 μM , preparación al momento.
- PBS: *Phosphate-Buffer Saline*, 9.4g/L NaCl, 1.80g/L $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.56g/L $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4.
- PBS (*Phosphate-Buffer-Saline*), Invitrogen (Paisley, UK).
- Compuestos fenólicos, se disolvieron a una concentración 100 μM y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.
- α -tocoferol usado como control de oxidación, Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Equipo y material

- Espectrofotómetro UVIKON 922 con carro móvil y opción a cinéticas, Kontron Instruments S.A. (Kaufbeuren, Germany)
- Baño termostatzado Ultraterm 6000-383 acoplado al espectrofotómetro, Selecta (Barcelona, Spain)
- Cubetas de cuarzo, Hellma (Müllheim, Germany)
- Espectrofotómetro de placa, Lector Multidetector de Placas Synergy HT Lambda 5 UV-espectrophotometer, Bio Tek Instruments Inc. (Bad Friedrichshall, Germany)
- Placa de 96 pocillos, Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany)
- Agitador magnético BIBBY HB 502, Afora (Barcelona, Spain)
- Ultracentrífuga CENTRIKON T-1055, Kontron Instruments S.A. (Kaufbeuren, Germany)
- Rotor T-45.6, Kontron Instruments S.A. (Kaufbeuren, Germany)

Preparación y conservación de la LDL

Se recolectó plasma de voluntarios sanos y la LDL (d=1.019-1063) se aisló por ultracentrifugación secuencial preparativa (Kleinvelde et al., 1992). Este método se basa en la diferente flotabilidad que tienen las partículas lipoproteicas sometidas a una fuerza centrífuga. La proteína se cuantificó por Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina de suero bovino como estandar. Una vez aislada, se alicuotó y se conservó a -80°C hasta su utilización.

Para eliminar las sales presentes en la alícuota de LDL que interfieren con la formación de dienos, se procedió a 24 h de diálisis en PBS, justo antes de su utilización.

Compuestos Fenólicos

Se utilizaron 19 compuestos fenólicos, con el α -tocoferol como estandar en la oxidación de la LDL. Se utilizaron compuestos comerciales y no comerciales. Los comerciales fueron utilizados sin purificar, y se citan junto con los extraídos a partir del AOV a continuación. Se disolvieron en metanol/agua (80:20 v/v) a una concentración 100 μ M. Los compuestos no comerciales fueron aislados a partir de un extracto fenólico de AOV por HPLC semipreparativa siguiendo el método de Artajo 2006 (Artajo et al., 2006).

Los compuestos fenólicos aislados a partir del AOV por HPLC semipreparativa son (ver también **Tabla 12**):

- a) Derivados secoiridoides, **3,4-DHPEA-AC** (4-(acetoxylethyl)-1,2-dihydroxybenzene), **3,4-DHPEA-EDA** (ácido 4-hexenoico, 4-formyl-3-(2-oxoethyl)-2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl ester) o ácido elenólico dialdehído del hidroxitirosol, **p-HPEA-EDA** (ácido 4-hexenoico, 4-formyl-3-(2-oxoethyl) 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl ester) o ácido elenólico dialdehído del tirosol; y
- b) Lignanos, (+)-1-**acetoxipinoresinol**.

Representada su estructura química en la **Figura 7**.

Tabla 12: Compuestos fenólicos extraídos del Aceite de Oliva Virgen por HPLC semipreparativa.

Compuestos extraídos de Aceite de Oliva Virgen

Derivados secoiridoides	
3,4-DHPEA-AC	4-(acetoxylethyl)-1,2-dihydroxybenzene
3,4-DHPEA-EDA	ácido elenólico dialdehído + hidroxitirosol
p-HPEA-EDA	ácido elenólico dialdehído + tirosol
Lignanos	
(+) -1-acetoxipinoresinol	

Los compuestos fenólicos comerciales utilizados y su procedencia son los siguientes (ver también **Tabla 13**):

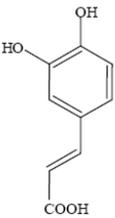
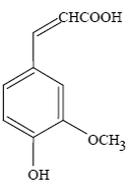
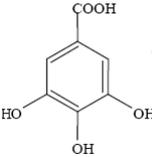
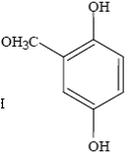
- a) Ácidos fenólicos, ***p*-ácido cumárico** (*trans*-4-hydroxycinnamic acid) y **vanillina** de Extrasynthese (Genay, Francia); y **ácido cafeico** (ácido 3,4-dihydroxycinnámico), **ácido ferúlico**, y **ácido gálico** (ácido 3,4,5-trihydroxybenzoico) de Fluka Co. (Buchs, Switzerland);
- b) Fenil etil alcoholes, **hidroxitirosol** o 3,4-DHPEA (2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl alcohol), **tirosol** o *p*-HPEA (2-(4-hydroxyphenyl) ethyl alcohol); de Extrasynthese (Genay, France)
- c) Secoiridoides, **oleuropeína** de Extrasynthese (Genay, France);
- d) Derivados hydrocinámicos, **verbascósido** de Extrasynthese (Genay, France);
- e) Lignanós, **(+)-pinoresinol** de Arbonova Sales (Turku, Finland); y
- f) Flavonoides, **apigenina** (4',5,7-tihydroxyflavona), **apigenina 7-O-glucósido**, **luteolina** (3',4',5,7-tetrahydroxyflavona), **luteolina 7-O-glucósido** y **rutina** ((2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,5-dihydroxy-3-fofan-2-yl]oxy-chromen-7-one) Extrasynthese (Genay, Francia)

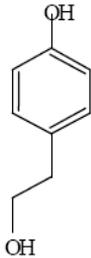
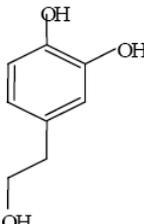
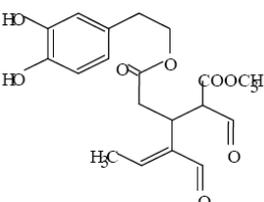
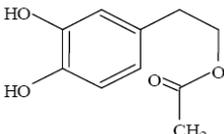
Representada su estructura química en la **Figura 7**.

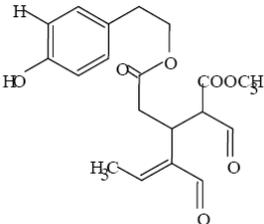
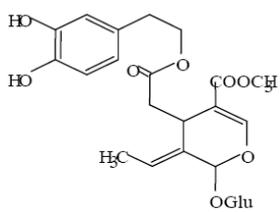
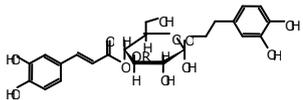
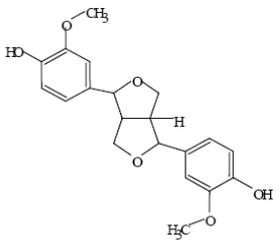
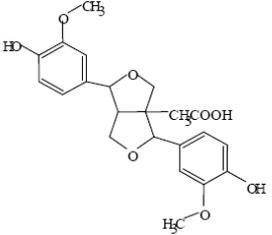
Tabla 13: Patrones comerciales de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva que se han utilizado en este estudio, y su procedencia.

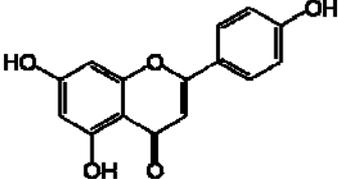
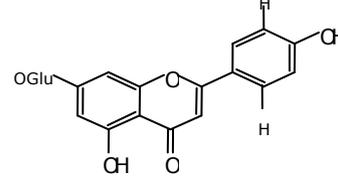
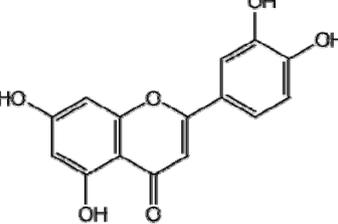
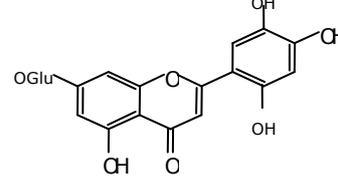
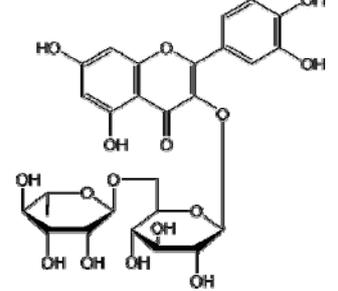
Patrones comerciales		Procedencia
Ácidos fenólicos		
Ácido <i>p</i> -cumárico		Extrasynthese (Genay, France)
Vainillina		Extrasynthese (Genay, France)
Ácido cafeico		Fluka Co. (Buchs, Switzerland)
Ácido ferúlico		Fluka Co. (Buchs, Switzerland)
Ácido gálico		Fluka Co. (Buchs, Switzerland)
Fenil etil alcoholes		
Hidroxitirosol	3,4-DHPEA	Extrasynthese (Genay, France)
Tirosol	<i>p</i> -HPEA	Extrasynthese (Genay, France)
Secoiridoides		
Oleuropeína		Extrasynthese (Genay, France)
Derivados hidrocínámicos		
Verbascósido		Extrasynthese (Genay, France)
Lignanós		
(+)-pinoresinol		Arbonova Sales (Turku, Finland)
Flavonoides		
Apigenina		Extrasynthese (Genay, France)
Apigenina 7- <i>O</i> -glucosido		Extrasynthese (Genay, France)
Luteolina		Extrasynthese (Genay, France)
Luteolina 7- <i>O</i> -glucosido		Extrasynthese (Genay, France)
Rutina		Extrasynthese (Genay, France)

Figura 7: Estructura química de los diferentes compuestos fenólicos utilizados en el estudio.

Grupo	Compuestos
Ácidos fenólicos	Cafeico 
	<i>p</i>-Cumárico 
	Ferúlico 
	Gálico 
	Vainillina 

Fenil etil alcoholes	Tirosol 
	Hidroxitirosol 
Secoiridoides	3,4-DHPEA-EDA 
	3,4-DHPEA-AC 

	<p><i>p</i>-HPEA-EDA</p> 
	<p>Oleuropeína</p> 
Derivados Hidrocinámicos	<p>Verbascósido</p> 
Lignanos	<p>(+)-Pinoresinol</p> 
	<p>(+)-1-Acetoxipinoresinol</p> 

Flavonoides	Flavonas	Apigenina 
		Apigenina-7-O-Glu 
		Luteolina 
		Luteolina-7-O-Glu 
	Flavonoles	Rutina 

Procedimiento: Oxidación de la LDL, valorado por la Formación de Dienes Conjugados

Dividido en tres etapas:

- a) Estudio *Dosis-efecto*,
- b) Estudio a *concentración fija* y
- c) *Sinergias*,

siendo el procedimiento común a las tres etapas.

1. Ajustar la LDL dializada a una concentración de 50 µg/ml en PBS, pH 7.4, teniendo en cuenta el volumen final, 2.5 ml en a y b, ó 200 µl en c, según proceda (PBS vol= vol final - vol LDL - vol compuesto - vol Cu²⁺).
2. Añadir el compuesto o mezcla de compuestos a estudiar, a la concentración adecuada a cada etapa (a: 0-20 µM, b: 0.5 µM ó c: 0.2 µM, respectivamente).
3. Iniciar la oxidación añadiendo una solución fresca de CuCl₂-2H₂O 30 µM (concentración final 6 µM).
4. Agitar y medir (**Tabla 14**).

Tabla 14: Esquema de la preparación de la mezcla de reacción para la formación de dienos conjugados en las tres etapas a, b y c.

	a.Dosis-efecto	b. Conc fija	c. Sinergias
LDL	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
PBS	csp	csp	csp
Comp Fenólicos	0-20 µM	0.5 µM	0.2 µM/comp
Cu ²⁺ 30µM	6 µM	6 µM	6 µM
Vol final	2.5 ml	2.5 ml	200 µl

Csp: cantidad suficiente para el volumen final deseado (PBS vol= vol final - vol LDL - vol compuesto - vol Cu²⁺). Conc fija: concentración fija.

Los parámetros de la cinética de oxidación de la LDL fueron determinados por monitorización del cambio de absorbancia a 234 nm a 30°C con Espectrofotómetro Kontron, UVIKON 922 en los casos *a* y *b*, y Espectrofotómetro Lector Multidetector de Placas Synergy HT Lambda 5 UV-espectrofotometer, Bio Tek en el caso *c*. La LDL no tratada con compuestos fenólicos se utilizó como control de oxidación (control LDL). Dado que los compuestos fenólicos están disueltos en metanol, los blancos se prepararon con el mismo volumen de metanol que las muestras de compuestos fenólicos. Para asegurarnos que el metanol no interfería con la oxidación, se preparó una muestra control con LDL, PBS, metanol y cobre. No se detectaron

interferencias en la formación de dienos conjugados debido a la presencia de metanol.

Cada compuesto se analizó por triplicado en el caso del estudio dosis efecto y concentración fija, y ocho réplicas en el estudio de sinergias. Se llevaron a cabo al menos tres repeticiones de cada ensayo para cada compuesto.

ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE LA ECA

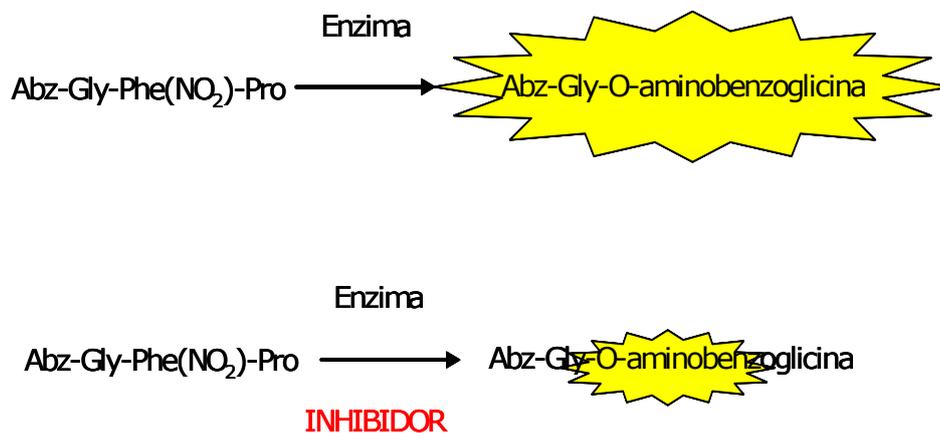
Fundamento

El objetivo es determinar si los polifenoles del AOV tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ECA pudiendo con ello ejercer una disminución de la presión arterial.

La ECA es una peptidasa de membrana, cuyo centro activo necesita Zn^{2+} como cofactor para poder llevar a cabo la hidrólisis de su sustrato. Su principal función es hidrolizar histidil-leucina de la angiotensina I formando el potente vasoconstrictor angiotensina II, esta liberación terminará produciendo una subida de presión arterial. Al actuar a nivel de la enzima, estaríamos inhibiendo la transformación de la angiotensina I en el péptido activo angiotensina II y por tanto evitando la subida de presión arterial.

Basándonos en el método de Sentandreu (Sentandreu and Toldra, 2006; Sentandreu and Toldrá, 2006) modificado, utilizamos el análogo de la angiotensina I Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro como sustrato de la enzima, cuya hidrólisis da lugar a un producto fluorescente Abz-Gly-O-aminobenzoglicina que puede ser fácilmente cuantificado por fluorometría (**Figura 8**).

Figura 8: Esquema de la reacción enzimática de la ECA en presencia del sustrato análogo utilizado en el estudio, y la fluorescencia emitida en presencia o ausencia de compuesto inhibidor.



La presencia de un compuesto inhibidor de la enzima da lugar a una menor emisión de fluorescencia, a partir de esta diferencia, se calcula el % de inhibición (%INH) de la enzima por parte del compuesto. Para calcular dicho porcentaje, se aplica la siguiente ecuación:

$$\%INH = 1 - \left(\frac{F \text{ muestra} - F \text{ b muestra}}{F \text{ control} - F \text{ blanco}} \right) \times 100$$

donde:

Fmuestra: Fluorescencia de la muestra (enzima, muestra y sustrato)

Fblanco muestra: F del blanco de muestra (muestra y sustrato)

Fcontrol: F del control (enzima y sustrato)

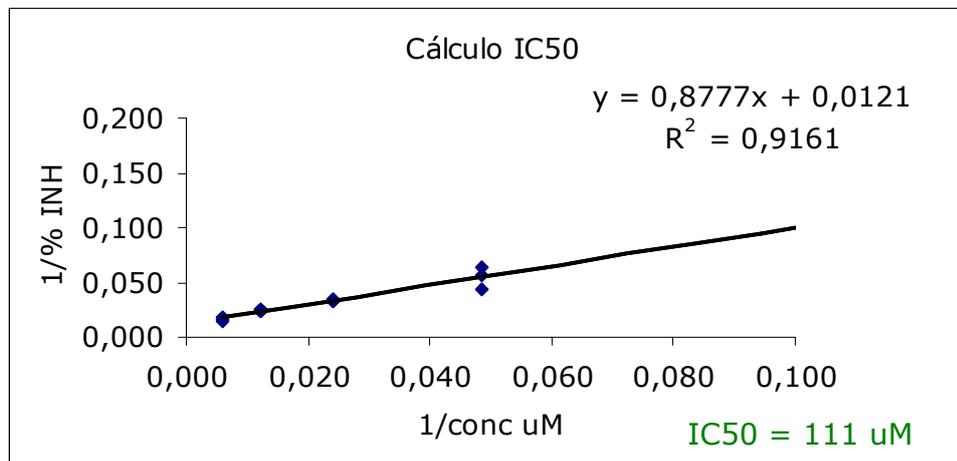
Fblanco: F del blanco (sustrato)

La capacidad IECA por parte del compuesto en estudio se expresa como IC_{50} o concentración (μM) de compuesto necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA. Para calcular dicho valor, se representa la inversa de los porcentajes de inhibición frente a la inversa de las concentraciones (**Figura 9**); A partir de la ecuación obtenida de dicha gráfica, se obtiene el valor de IC_{50} .

Reactivos

- Sustrato de la ECA: O-aminobenzoylglycyl-*p*-nitro-*L*-phenylalanyl-*L*-proline (Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro), Bachem Freinchemikalien (Buben-dorf, Switzerland)
- ECA de pulmón de conejo (Peptidyl-dipeptidase A, E.C. 3.4.15.1, Sigma-Aldrich (Madrid, Spain))
- ZnCl₂, Merck (Darmstadt, Germany)
- NaCl, Panreac (Barcelona, Spain)

Figura 9: Representación de la inversa del % Inhibición frente a la inversa de la concentración, para el cálculo del IC₅₀



El valor de IC₅₀ se obtiene a partir de la ecuación de dicha gráfica.

Soluciones de trabajo

- **Solución A:** 150 mM Tris-base buffer (pH8.3) con 0,1 μ M ZnCl₂. Recién preparada.
- **Solución B:** 150 mM Tris-base buffer (pH8.3) con 1125 mM NaCl.

Solución de trabajo del sustrato: 0.45 mM (Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro) en solución B. Mantener a 4°C.

Dilución de las muestras: Para calcular el IC₅₀ necesitamos una batería de diluciones, teniendo además en cuenta que la muestra se diluirá 1:6 (40 μ l/240 μ l volumen del pocillo) al añadirlo en el pocillo.

Equipo y material

- Placas de 96 pocillos para fluorimetría (300-500 μ l), BMG LABTECH GmbH (Offenburg, Germany).
- Fluorímetro, FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH (Offenburg, Germany). La fluorescencia generada se midió a intervalos de 15 min durante una hora a 37°C. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 350 y 420, respectivamente.

Preparación de la ECA

- ECA solución stock. La ECA se diluyó en 5 ml de glicerol al 50%, esta solución se alicuotó y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.
- ECA solución de trabajo. Se prepara una dilución 1:24 en la Solución A, preparada fresca el día del experimento.

Compuestos fenólicos

Utilizamos los siguientes compuesto fenólicos: tirosol, hidroxitirosol, ácido cumárico, ácido ferúlico, luteolina, pinosresinol, p-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EDA. La procedencia y estructura química aparecen citadas en **Tabla 13** y **Tabla 12**, y en la **Figura 7**.

Se disolvieron en metanol/agua al 40% a las concentraciones indicadas en la **Tabla 15**. El captopril se utilizó como inhibidor control.

Tabla 15: Concentración μM de cada compuesto fenólico utilizado en la determinación de la actividad IECA.

Compuesto	mM en MetOH 40%	Diluciones utilizadas (μM)			
		1	1:2	1:4	1:8
Hidroxitirosol	79.9	13316.7	6658.3	3329.2	1664.6
Tirosol	6.7	1116.7	558.3	279.2	139.6
Ácido p-cumárico	15.2	2533.3	1266.7	633.3	316.7
Ácido ferúlico	15.4	5133.3	2566.7	1283.3	641.7
Luteolina	1.7	283.3	141.7	70.8	35.4
Pinoresinol	11.2	1866.7	933.3	466.7	233.3
p-HPEA-EDA	1.8	303.5	151.7	75.9	37.9

MetOH: metanol.

Procedimiento: Actividad IECA

En cada pocillo poner:

1. Compuesto fenólico a estudiar, se prepararon las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 en agua Milli-Q de cada compuesto a partir de las diluciones citadas en el apartado anterior.
2. Enzima, 0.042 UI en 150 mM Tris-base buffer (pH8.3) con 0.1 μM ZnCl_2 .
3. Sustrato, 0.45 mM Abz-Gly-Phe(NO_2)-Pro en 150 mM Tris-base buffer (pH8.3) con 1125 mM NaCl.
4. Poner en el fluorímetro, agitación automática de la placa durante 5 segundos (**Tabla 16**).

5. Medir la fluorescencia generada a los 30 min de incubación, a 37°C a intervalos de 15 min durante 1 h. Fluorímetro, FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH cuyas longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 350 nm y 420 nm, respectivamente.

Tabla 16: Preparación de la mezcla de reacción para el estudio IECA de compuestos fenólicos del aceite de oliva, incluidos blancos y controles necesarios.

Volumen	Blanco	Control	B muestra	Muestra
40 µl	Metanol	Enzima	Metanol	Enzima
40 µl	ZnCl ₂ (Solución A)	H ₂ O	Muestra	Muestra
160 µl	Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato

B muestra: Blanco de muestra

Al determinar la actividad ECA incluimos varios controles: a) el blanco para medir la fluorescencia emitida por el sustrato, b) el control para medir la fluorescencia emitida por la enzima y el sustrato juntos y c) el blanco de muestra para medir la fluorescencia emitida por la muestra con el sustrato. Se prepararon el blanco y el blanco de la muestra siguiendo el protocolo pero poniendo metanol al ser éste el solvente de los compuestos fenólicos.

La muestra a analizar incluye muestra, enzima y sustrato, ver **Tabla 16**.

Se representó la inversa de los porcentajes de inhibición frente a la inversa de las concentraciones; a partir de la ecuación obtenida de la parte lineal de la curva de dicha gráfica, se obtuvo el valor de IC_{50} . Se utilizó como control de inhibición el captopril, medicamento antihipertensivo IECA, con un IC_{50} de $0.02 \mu\text{M}$.

Salvo que se indique lo contrario, dicha actividad se midió por triplicado, y se llevaron a cabo 3 repeticiones del ensayo para cada compuesto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Para comparar las medias se utilizó el test ANOVA seguido de un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró una diferencia significativa para un valor de $p < 0.05$. El estudio estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS versión 15.0 (*Statistical Package for the Social Science Software*). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Los valores de IC_{50} se expresan como la media \pm SD, fueron calculados a partir de curvas dosis respuesta obtenidas por la representación de la inversa del porcentaje de inhibición frente a la inversa de la concentración. El ajuste de los datos se llevó a cabo con el *software* PRISM versión 4.02 para Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).



RESULTADOS

RESULTADOS

Curvas dosis efecto de compuestos fenólicos individuales en la oxidación de la LDL inducida por Cu²⁺

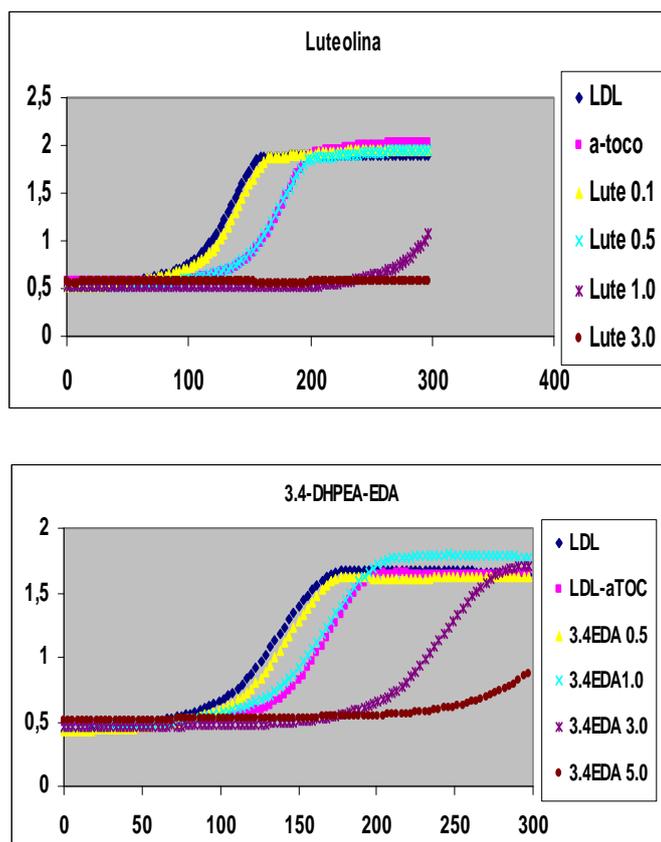
La **Figura 10** muestra la estructura molecular de los 19 compuestos fenólicos utilizados para evaluar la concentración mínima que produce la inhibición en la formación de dienos conjugados, medido como *Lag Phase*; una medida del efecto inhibitorio o antioxidante sobre la oxidación de la LDL mediada por cobre.

Observamos que todos los compuestos probados ejercen efecto sobre la oxidación de la LDL. De cada compuesto obtenemos una curva dosis efecto para el rango de concentración de 0-20 μM ; a partir de las cuales se observa que, hidroxitirosol y verbascósido muestran efecto inhibitorio a una concentración 2 μM , mientras que 3,4-DHPEA-EDA, ácido cumárico, apigenina, tirosol, ácido ferúlico y (+)-pinoresinol requieren concentraciones de hasta 20 μM para inducir inhibición total de la oxidación de la LDL (ver **Figura 11**).

Las curvas dosis efecto de los compuestos muestran que 0.5 μM es la concentración mínima que presenta una elongación de la *Lag Phase* de la oxidación de la LDL, con respecto a la LDL control (sin presencia de compuesto fenólico). Por tanto,

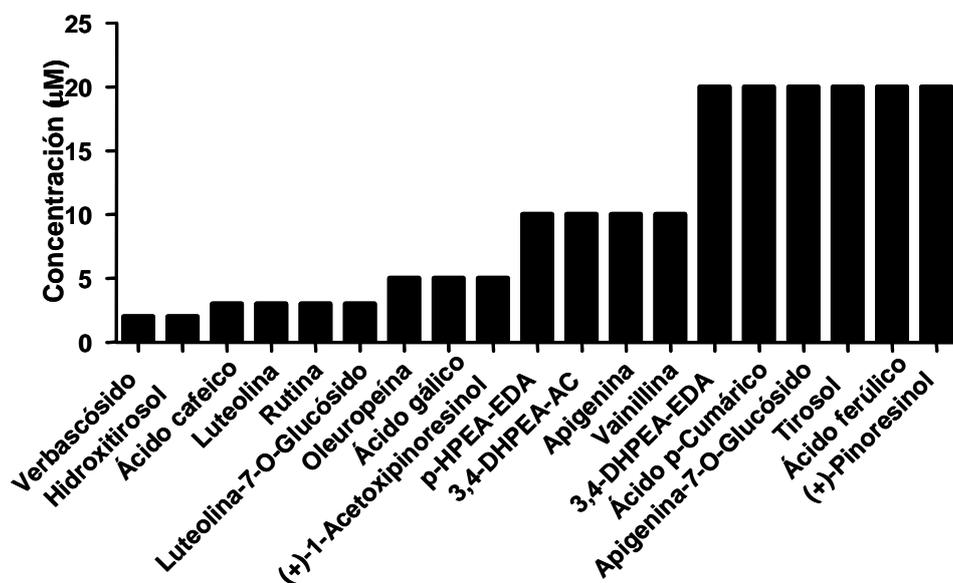
fue 0.5 μM la concentración de compuesto fenólico elegido para continuar con el estudio de la capacidad antioxidante de estos compuestos fenólicos.

Figura 10: Curvas dosis efecto de luteolina y 3,4-DHPEA-EDA en un rango de concentraciones de 0.1 – 5 μM .



Para alcanzar una inhibición total de la oxidación, la luteolina requiere una concentración de 3 μM , mientras que el 3,4-DHPEA-EDA todavía necesitará concentraciones superiores. Se representa *Lag Phase* en minutos (abcisas), frente a absorbancia a 234 nm, α -tocoferol como antioxidante control.

Figura 11: Concentraciones necesarias de los diferentes compuestos fenólicos del aceite de oliva para la inhibición total de la *Lag Phase* de la LDL.

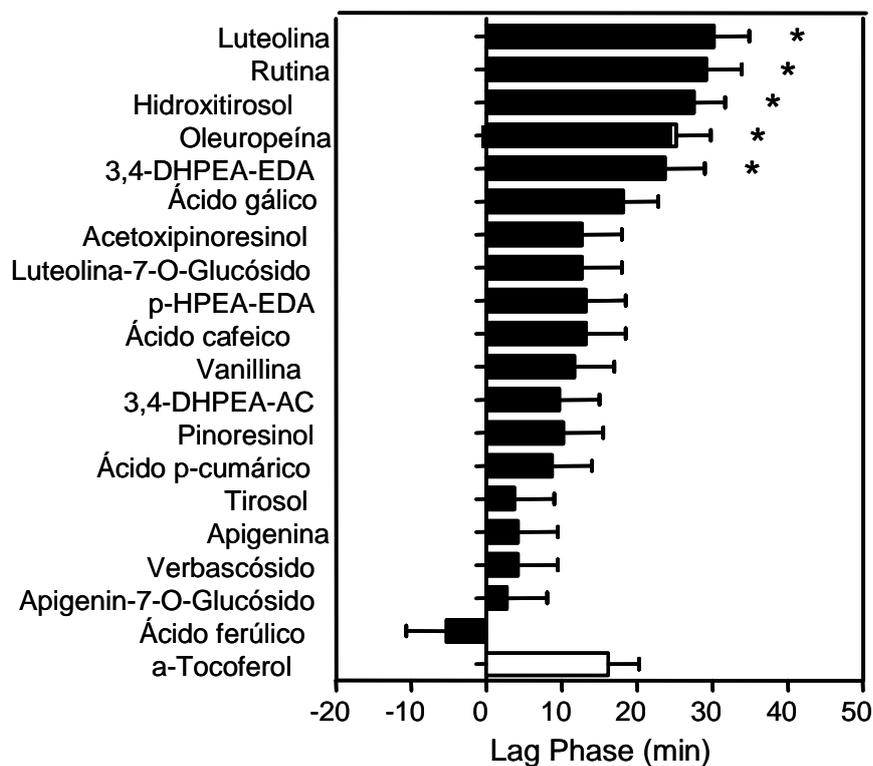


Luteolina, rutina, hidroxitirosol, oleuropeína, 3,4-DHPEA-EDA, ácido gálico, acetoxipinoresinol, luteolina-7-O-glucósido, p-HPEA-EDA, ácido cafeico, apigenina, vainillina, 3,4-DHPEA-AC, pinoresinol, ácido cumárico, tirosol, apigenina-7-O-glucósido, verbascósido y ácido ferúlico. *Lag Phase* en minutos. Cada compuesto se probó en el rango de 0 a 20 μM, y el α-tocoferol a 0.5 μM como control.

Efecto de los compuestos fenólicos individuales sobre la *Lag Phase* en la oxidación de la LDL inducida por Cu^{2+} a concentración 0.5 μM .

Cada uno de los 19 compuestos se probó a una concentración 0.5 μM utilizando como referencia la LDL sin compuesto fenólico añadido, y el α -tocoferol como antioxidante control. Los resultados se muestran en la **Figura 12**. La LDL incubada con α -tocoferol muestra un aumento de la *Lag Phase* de 16.2 ± 4.07 min (media \pm SEM) comparado con la LDL sola. Cinco compuestos fenólicos presentan un aumento significativo de la *Lag Phase* respecto de la LDL sola. Los valores en orden descendente son luteolina (30.2 ± 4.69 min), rutina (29.2 ± 4.69 min), hidroxitirosol (27.6 ± 4.06 min), oleuropeína (25.2 ± 4.69 min) y 3,4-DHPEA-EDA (23.7 ± 5.38 min) para una $p < 0.05$, respectivamente. Apigenina-7-O-glucósido, verbascósido, apigenina y tirosol, no mostraron efecto a esta concentración. El resto de compuestos fenólicos presentaban prolongación de la *Lag Phase*, pero sin alcanzar significación estadística. El ácido ferúlico presentaba una reducción discreta de la *Lag Phase* respecto a la LDL sola, sugiriendo un posible efecto pro-oxidante a esta concentración (5.3 ± 5.4 min).

Figura 12: Elongación de la *Lag Phase* de la LDL tras incubación con compuestos fenólicos de aceite de oliva (0.5 μ M).



Luteolina, rutina, hidroxitirosol, oleuropeína, 3,4-DHPEA-EDA, ácido gálico, acetoxipinoresinol, luteolina-7-O-glucósido, p-HPEA-EDA, ácido cafeico, apigenina, vainillina, 3,4-DHPEA-AC, pinoresinol, ácido cumárico, tirosol, apigenina-7-O-glucósido, verbascósido, ácido ferúlico y α -tocoferol como control. Los resultados expresan los minutos que aumenta la *Lag Phase* respecto a la LDL control (media \pm SEM) * $p < 0.05$ para el test de Bonferroni. Se realizan triplicados.

Efecto sinérgico de los compuestos fenólicos en el aumento de la *Lag Phase* en la oxidación de la LDL inducida por Cu^{2+}

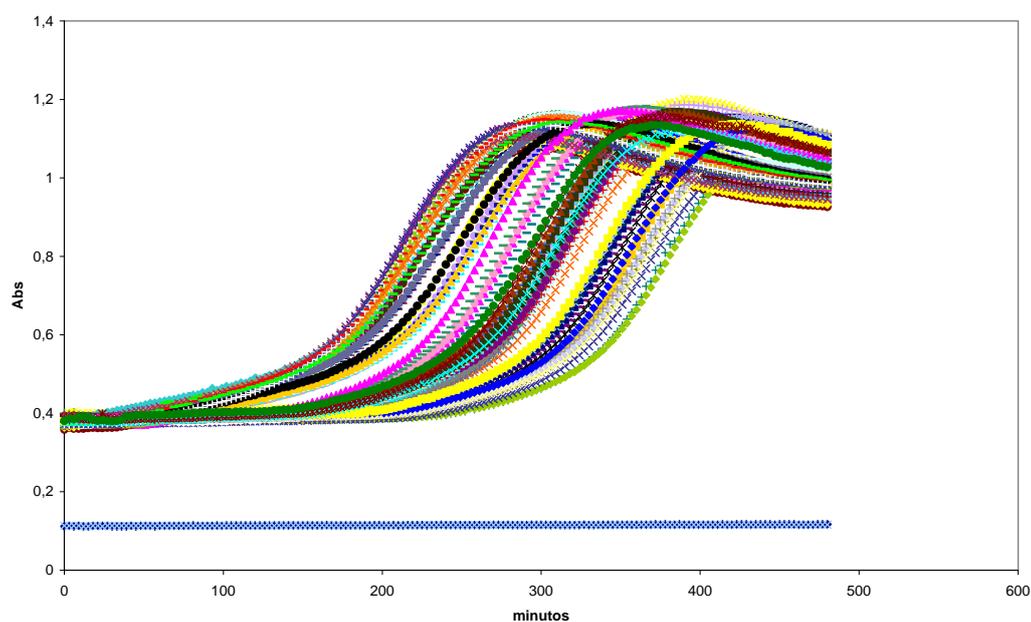
Los compuestos luteolina (L), rutina (R), hidroxitirosol (H), oleuropeína (O) y 3,4-DHPEA-EDA (D) presentaron mayor poder antioxidante y fueron seleccionados para realizar un nuevo test a una concentración más fisiológica ($0.2 \mu\text{M}$), en un intento por acercarnos a las concentraciones que se encuentran a nivel plasmático. Comprobamos que los cinco compuestos individualmente, a $0.2 \mu\text{M}$ siguen ejerciendo efecto antioxidante (**Figura 13**).

Las mezclas de 4 de estos compuestos presentan una *Lag Phase* de oxidación de la LDL de: HLOD 123.20 ± 14.09 < HORD 133.22 ± 16.85 < HLRD 139.18 ± 6.57 < LORD 150.41 ± 14.09 < HLOR 183.94 ± 22.05 . La mezcla de 5 compuestos (HLORD) da lugar a una *Lag Phase* de oxidación de la LDL de 207.46 ± 19.48 , ver **Figura 14**.

Calculamos el valor esperado de *Lag Phase* de cada combinación de compuestos como la suma de *Lag Phase* de cada compuesto individual (ver **Tabla 17** y **Figura 15**). Al compararlo con el resultado obtenido de dichas combinaciones se observa que la combinación de 5 compuestos presenta un valor observado 1.8 veces al esperado. Por tanto se observa

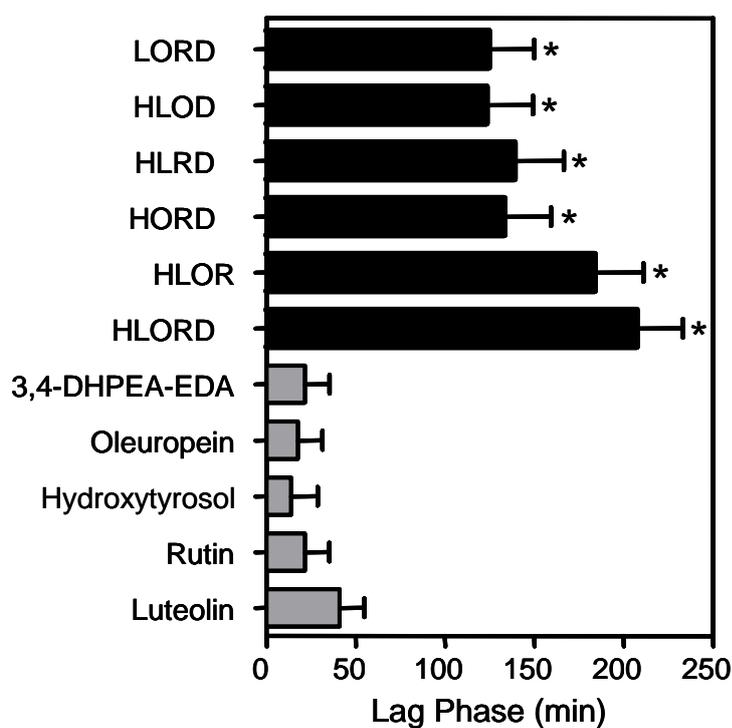
un efecto sinérgico por parte de la combinación de estos 5 compuestos.

Figura 13: Ejemplo de gráfica de la formación de dienos conjugados en la oxidación de la LDL inducida por cobre, en presencia de combinaciones de compuestos fenólicos.



Representación de la *Lag Phase* en minutos frente a la absorbancia a 234 nm. Cada color de la gráfica se corresponde con un pocillo de los 96 que tiene la placa. Se miraron 5 compuestos individualmente (H: hidroxitirosol, L: luteolina, O: oleuropeína, R: rutina y D: 3,4-DHPEA-EDA) y sus posibles combinaciones (LORD, HLOD, HLRD, HLOR y HLORD) a 0.2 μ M cada uno. Ocho repeticiones de cada muestra, y se hicieron quintuplicados. A partir de cada una de las gráficas se calcula la *Lag Phase*.

Figura 14: Efecto de 5 compuestos fenólicos, individuales o en diferentes combinaciones, sobre la *Lag Phase* de oxidación de la LDL.



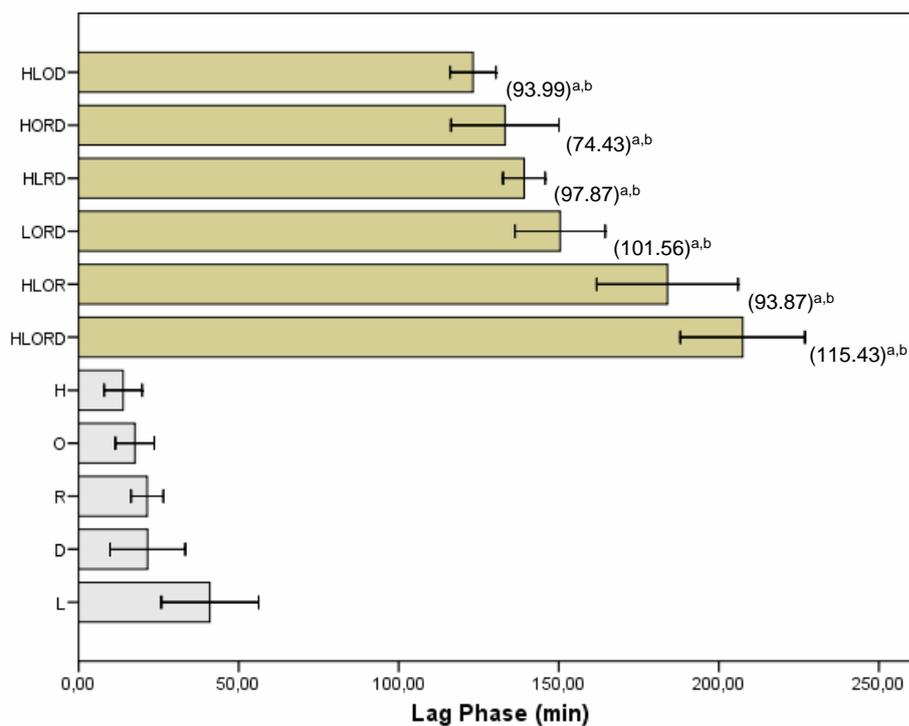
Concentración 0.2 μM por compuesto. H: hidroxitirosol, L: luteolina, O: oleuropeína, R: rutina y D: 3,4-DHPEA-EDA. Los resultados expresan los minutos (media \pm SEM) que aumenta la *Lag Phase* respecto a la LDL control a partir de quintuplicados, para una $*p < 0.05$ en test de Bonferroni.

Tabla 17: Elongación de la *Lag Phase* tras incubar LDL con compuestos fenólicos 0.2 μM (valor observado), individuales o combinaciones, con respecto a la LDL control (sin compuestos fenólicos), y el efecto esperado (valor esperado).

Compuesto fenólico	<i>Lag Phase</i> (min) Valor observado (media \pm SEM)	<i>Lag Phase</i> (min) Valor esperado (suma de los efectos individuales)
<i>Individual</i>		
L	41.00 \pm 15.23	
D	21.56 \pm 11.75	
R	21.44 \pm 5.06	
O	17.56 \pm 13.64	
H	13.87 \pm 11.83	
<i>Combinaciones</i>		
HLORD ^{a,b}	207.46 \pm 19.48	115.43
HLOR ^{a,b}	183.94 \pm 22.05	93.87
LORD ^{a,b}	150.41 \pm 14.09	101.56
HLRD ^{a,b}	139.18 \pm 6.57	97.87
HORD ^{a,b}	133.22 \pm 16.85	74.43
HLOD ^{a,b}	123.20 \pm 14.09	93.99

^aMedia (valor observado) diferencia significativa respecto de la LDL control, $p < 0.05$ ANOVA. ^bMedia (valor observado) diferencia significativa respecto de la suma de los efectos individuales (esperado), $p < 0.05$ *t-Student test*. Para una $p < 0.05$ indica efecto sinérgico. H: hidroxitirosol, L: luteolina, O: oleuropeína, R: rutina y D: 3,4-DHPEA-EDA.

Figura 15: Elongación observada de la *Lag Phase* de la LDL en presencia de compuestos fenólicos a 0.2 μM , solos o combinados, con respecto a la LDL control (en ausencia de compuesto).



Entre paréntesis valores esperados de *Lag Phase*, calculados como la suma de los individuales

^aMedia (valor observado) diferencia significativa respecto de la LDL control (sin antioxidante) para $p < 0.05$, ANOVA.

^bMedia (valor observado) diferencia significativa respecto de la suma de los efectos individuales (valor esperado), para $p < 0.05$ *t-Student*. Para una $p < 0.05$ indica efecto sinérgico.

H: hidroxitirosol, L: luteolina, O: oleuropeína, R: rutina y D: 3,4-DHPEA-EDA.

Efecto inhibidor de la ECA por parte de los compuestos fenólicos

Al incubar la ECA en presencia de compuestos fenólicos del aceite de oliva, observamos que, a: existe inhibición por parte de dichos compuestos, b: dicha inhibición es dosis dependiente, y c: existen diferentes grados de inhibición (**Tabla 18**). De los 8 compuestos que se probaron, la luteolina y el 3,4-DHPEA-EDA presentan un IC_{50} inferior a 100 μM , con valores (media \pm SD) de $52.3 \pm 4.7 \mu M$ y $57.5 \pm 9.0 \mu M$, respectivamente, siendo los más activos. De los otros 6 compuestos, 5 presentan valores superiores a 100 μM , que varían desde 160 μM del p-HPEA-EDA a más de 4000 μM del hidroxitirosol. A excepción del hidroxitirosol, los valores detectados se sitúan por debajo de los 500 μM necesarios para poder ejercer efecto fisiológico, según se cita en la bibliografía. Están representados los valores en la **Figura 16**.

Por el contrario, el IC_{50} del tirosol no se pudo determinar, ya que a la concentración más alta ensayada no mostró una inhibición de la ECA superior al 50% (ver **Tabla 19**).

Tabla 18: Inhibición de la ECA ejercida por compuestos fenólicos del aceite de oliva, expresada como IC₅₀ (μM).

Compuesto	IC ₅₀ μM		
	Media	SD	CV
Hidroxitirosol	4557.9	780	17.1
Ac cumárico	327.0	75.3	23.0
Ac ferúlico	252.4	57.5	22.8
Pinoresinol	181.4	36.8	20.3
p-HPEA-EDA	160.4	19.7	12.3
3,4-DHPEA-EDA	57.5	9.0	15.7
Luteolina	52.3	4.7	8.9

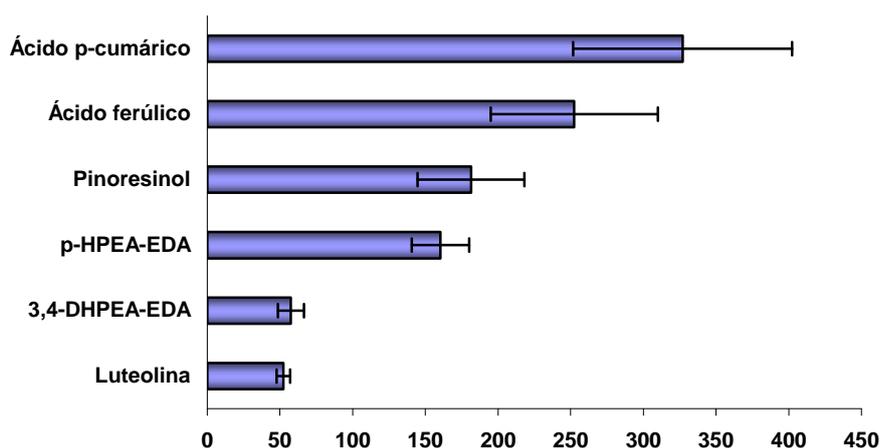
Se realizaron triplicados con tres lecturas por réplica. SD: desviación estandar, CV: coeficiente de variación interensayo (%)

Tabla 19: Inhibición ejercida por el tirosol sobre la actividad enzimática de la ECA.

Compuesto	% INH ECA		
	Media	SD	CV
Tirosol (1117 μM)	9.34	1.30	13.9

Se realizaron triplicados. SD: desviación estandar, CV: coeficiente de variación interensayo (%)

Figura 16: Valores de IC_{50} de compuestos fenólicos del aceite de oliva



Se realizaron triplicados con tres lecturas por réplica. Se representa la media \pm SD.

Tras calcular el valor de IC_{50} de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, lo relacionamos con el peso molecular, el número de grupos -OH y la disposición de los mismos en la anillo (*orto-dihidroxi*).

- ❖ El ordenar los compuestos por su peso molecular nos lleva a una gradación casi continua desde 164 g/mol del ácido cumárico hasta los 358 g/mol del pinoresinol. En cuanto al número de -OH se observa que tenemos tres grupos

diferenciados: cumárico, ferúlico y p -HPEA-EDA con un sólo -OH, y pinosinol y 3,4-DHPEA-EDA con dos. Por otro lado se desmarca la luteolina con cuatro. Siendo luteolina y 3,4-DHPEA-EDA los que presentan una distribución espacial *orto-dihidroxi* de los grupos hidroxilo (ver **Tabla 20**).

- ❖ Si una vez ordenados los compuestos por su peso molecular en sentido ascendente, tenemos en cuenta el IC_{50} , se podría establecer una tendencia de este parámetro a disminuir; es decir, el aumento de peso molecular produciría un ligero aumento en la capacidad IECA. Se observa que luteolina y 3,4-DHPEA-EDA no se ajustan a esta progresión, y producen un efecto claramente superior (ver **Tabla 20** y **Figura 17a**)
- ❖ El estudio de los valores de IC_{50} frente al número de -OH, muestra claramente que un mayor número de éstos, y una distribución *orto-dihidroxi* favorece la inhibición de la ECA (ver **Tabla 20** y **Figura 17b**) lo que explicaría la inflexión del 3,4-DHPEA-EDA con dos -OH *orto-dihidroxi*, y el de la luteolina, que presenta 4 -OH, dos de ellos con esta misma distribución.

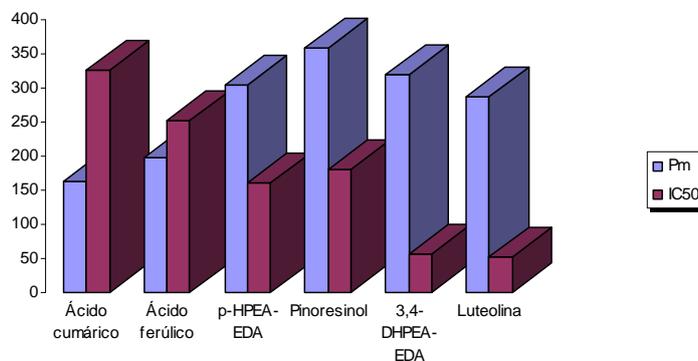
Tabla 20: Relación entre peso molecular, número de grupos hidroxilo y valor de IC₅₀.

Compuesto	Pm g/mol	IC ₅₀ μM	Nº -OH	<i>Orto- dihidroxi</i>	<i>LagPhase</i> (min)
Tirosol	138		2		
Hidroxitirosol	154	4557.9	3	si	13.87
Ac cumárico	164	327.0	1		
Ac ferúlico	198	252.4	1		
Luteolina	286	52.3	4	si	41.00
p-HPEA-EDA	304	160.4	1		
3,4-DHPEA-EDA	320	57.5	2	si	21.56
Pinoresinol	358	181.4	2		

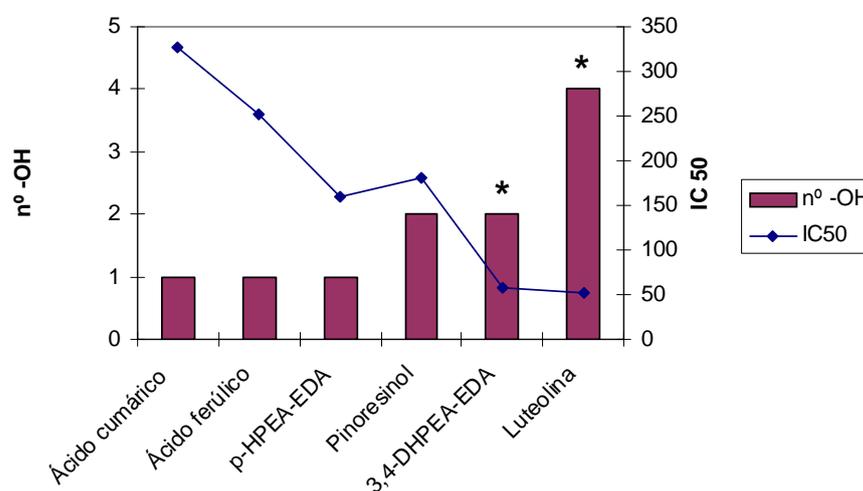
Relación entre peso molecular (Pm), valor de IC₅₀ (μM), número de grupos hidroxilo (-OH), su disposición en el anillo aromático (*orto-dihidroxi*) y el valor de *Lag Phase* en minutos en presencia de compuestos a 0.2 μM, respecto a la LDL control (sin antioxidante), de los compuestos analizados.

Figura 17: Relación entre peso molecular, número de grupos hidroxilo y valor de IC₅₀.

a.



b.



a. Tendencia a disminuir el IC₅₀ con el peso molecular del compuesto, y b. Drástica reducción del IC₅₀ por la presencia de grupos hidroxilo en posición *orto-dihidroxi*. Pm: peso molecular, IC₅₀: concentración necesaria para inhibir el 50% de la enzima, n° -OH: número de grupos hidroxilo que presenta la molécula. * distribución *orto-dihidroxi*.



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Estudio sobre oxidación

Los 19 compuestos fenólicos, utilizados para medir su capacidad antioxidante *in vitro* sobre la LDL, han demostrado que la mitad de ellos ejercen su actividad a una concentración de 10 μM . Este valor está situado en la zona baja del rango de concentraciones (entre $<0.1 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$) requerido en estudios *in vitro* que permitan elucidar los efectos ejercidos (Hooper et al., 2008; Williamson and Manach, 2005).

Luteolina, rutina, hidroxitirosol, oleuropeína y 3,4-DHPEA-EDA fueron los compuestos más efectivos aumentando la *Lag Phase* de oxidación de la LDL inducida por Cu^{2+} . Cuando se compara la suma de *Lag Phase* de cada uno de estos compuestos individualmente con la *Lag Phase* de los 5 juntos, ésta última es aproximadamente 2 veces la anterior. De modo que, podríamos afirmar que cuando se utilizan los 5 compuestos juntos (a $0.2 \mu\text{M}$ cada uno), se observa un efecto sinérgico.

Girona *et al.* (Girona et al., Submitted) en un estudio preliminar de detección de compuestos fenólicos de aceite de oliva virgen en plasma postprandial, detectan 4 de los 5 compuestos aquí citados con mayor poder antioxidante. Tras la ingesta de 40 ml de AOV, llevan a cabo determinaciones a los 0, 30, 60, 120 y 240 min de la ingestión. Detectan luteolina cuya concentración llega hasta $0.013 \mu\text{M}$ a los 60

min, 3,4-DHPEA-EDA 1.17 μM , oleuropeína aglicona a 0.067 μM a los 120 min e hidroxitirosol a 1.66 μM a los 120 min post-ingestión, no detectando la rutina. El 3,4-DHPEA-EDA no había sido descrito anteriormente en plasma humano postprandial, por el contrario, la rutina que sí ha sido descrita por otros autores (Lamuela-Raventos et al., 1999), no es detectada en este caso, quizá por no ser un constituyente del aceite ingerido, o por estar por debajo del límite de detección de los aparatos.

Por tanto, dichos compuestos en una ingesta de 40 ml de AOV media en la dieta mediterránea, presentan una biodisponibilidad tal que permite su detección a una concentración $<2 \mu\text{M}$. Estas concentraciones plasmáticas están de acuerdo con las de otros compuestos que raramente superan los 10 μM (Hooper et al., 2008; Williamson and Manach, 2005).

Las actividades antioxidantes de los diferentes compuestos fenólicos considerados en este estudio se pueden relacionar, al menos en parte, con su estructura química (Rice-Evans et al., 1996). Para los secoiridoides, un estudio temprano de Leenen y colaboradores (Leenen et al., 2002) muestra que los compuestos que presentaban la estructura *orto-dihidroxi* en el fenol (hidroxitirosol y oleuropeína tanto en las formas glicosídicas como en las aglicona) fueron más eficientes que sus homólogos *mono-hidroxi* (tirosol y ligstrósido tanto en las formas glicosídicas como en las aglicona) en el aumento de la resistencia de la LDL a la oxidación. Por tanto, la capacidad

antioxidante de la luteolina fue mayor que la de luteolina-7-O-glucósido, en el cual, la glucosa está unido al grupo *orto-dihidroxi* en la posición C7, unido a un anillo aromático. El 3,4-DHPEA-EDA, aunque no incluido en el citado trabajo de Leenen (Leenen et al., 2002), como secoiridoide, comparte con la oleuropeína la presencia de dos grupos -OH en posición *orto-dihidroxi*, lo que quizá ayude a explicar su comportamiento como antioxidante. La rutina, no secoiridoide, pero igualmente presenta en su estructura molecular esta misma disposición de los -OH.

El sistema digestivo humano produce la pérdida de la glucosa de la oleuropeína (Bendini et al., 2007) y, como consecuencia, la oleuropeína disponible en plasma humano tras la ingesta de AOV, corresponde a su estructura aglicona. No obstante, la oleuropeína aglicona conserva el esqueleto común de los secoiridoides (ésteres del ácido elenólico con el hidroxitirosol) responsable de la actividad antioxidante de la oleuropeína (Bendini et al., 2007), lo que podría explicar su función sobre el aumento de la resistencia de la LDL a la oxidación *in vivo*. La detección de 3,4-DHPEA-EDA, en plasma postprandial, es de especial interés dado que es el principal componente de los compuestos fenólicos del AOV (Suarez et al., 2008). La concentración de 3,4-DHPEA-EDA detectada en plasma postprandial llega a 1.17 μM a los 120 min post ingestión, y 0.2 μM la utilizada en este estudio *in vitro*; estos datos vienen a confirmar que se ha conseguido un acercamiento a concentraciones fisiológicas (biodisponibilidad *versus in vitro*).

Por tanto, en el futuro serán necesarios estudios que se centren en los efectos biológicos de los compuestos fenólicos del AOV en humanos.

Está claro que los componentes de los alimentos deben estar presentes en formas biodisponibles para poder ejercer su efecto. Ha habido grandes avances en los últimos años en el conocimiento de la absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos (Aguilera et al., 2004; Covas, 2007; Fito et al., 2007b; Visioli et al., 2005a), y aparentemente la mayoría de las clases de polifenoles presentan una absorción suficiente para ejercer su efecto biológico (Hooper et al., 2008; Williamson and Manach, 2005). Por ejemplo, la quercetina de las cebollas, las catequinas del vino tinto y las isoflavonas de la soja alcanzan concentraciones micromolares en plasma postprandial (Hooper et al., 2008; Williamson and Manach, 2005). Este hecho demuestra que los compuestos fenólicos atraviesan la barrera intestinal y alcanzan concentraciones en torrente circulatorio que se ha visto en algunos estudios que son capaces de ejercer su efecto *in vitro* (Hooper et al., 2008; Williamson and Manach, 2005). No obstante, los efectos concretos dependen de la clase de compuesto fenólico estudiado, y existen claras lagunas en el conocimiento actual.

Por otra parte, en el caso del AOV, haría falta demostrar la dosis, particularmente respecto a los secoiridoides, efectiva necesaria para reducir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares en humanos.

Además, muchos estudios (excepto los de isoflavonas) han trabajado con alimentos en lugar de compuestos aislados, y por tanto, los efectos detectados podrían ser atribuibles a otros componentes de dicho alimento, o a la presencia simultánea de varios compuestos. Finalmente, el metabolismo de la microflora necesita ser entendido en mayor profundidad, dado que podría ejercer un papel importante en la actividad biológica de muchos compuestos fenólicos. Éste es un acercamiento interesante, ya que hay un debate abierto sobre la necesidad de que la persona ingiera un compuesto fenólico purificado como suplemento dietético, o un determinado alimento (Hooper et al., 2008; Williamson and Manach, 2005), el AOV en nuestro caso.

Una limitación del estudio es que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido medida por un sólo sistema, resistencia a la oxidación de la LDL medida como la formación de dienos conjugados, estadio temprano de la peroxidación lipídica. Como confirmación de nuestros resultados *in vitro*, un estudio reciente demuestra que el 3,4-DHPEA-EDA expresa, *in vitro*, una función protectora del daño oxidativo causado por ROS en células humanas (Paiva-Martins et al., 2009).

En resumen, nuestros resultados sugieren que:

- La mayoría de los compuestos fenólicos, 18 de los 19 estudiados reducen la susceptibilidad a la oxidación de las LDL inducida por Cu^{2+} , por lo tanto la inhibición de la oxidación es dosis-dependiente y de forma lineal. Por el contrario, el ácido ferúlico muestra un efecto pro-oxidante a bajas concentraciones ($<5\mu\text{M}$).
- Los 19 compuestos estudiados reducen la susceptibilidad a la oxidación de las LDL a concentraciones diferentes. El hidroxitirosol y el verbascósido han mostrado, a una concentración baja de $2\mu\text{M}$, una inhibición de la oxidación de las LDL mientras que el 3,4-DHPEA-EDA, el ácido p-cumárico, la apigenina, el tirosol, el ácido ferúlico y el (+)-pinoresinol mejoran la susceptibilidad a concentraciones cercanas a $20\mu\text{M}$.
- Los 5 compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante, seguirían el siguiente orden decreciente: luteolina > rutina > hidroxitirosol > oleuropeína y > 3,4-DHPEA-EDA.
- Los 5 compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante (luteolina, rutina, hidroxitirosol, oleuropeína y 3,4-DHPEA-EDA) actúan de forma sinérgica aumentando la susceptibilidad de la LDL a la oxidación inducida por Cu^{2+} *in vitro*.

Estudio sobre la ECA

Siete de los 8 compuestos estudiados eran capaces de inhibir la ECA; luteolina y 3,4-DHPEA-EDA con IC_{50} de 52.3 y 57.5 μM , respectivamente ($<100 \mu\text{M}$), y ácido cumárico, ácido ferúlico, pinosresinol, p-HPEA-EDA e hidroxitirosol con valores superiores a 100 μM (327 μM , 252 μM , 181 μM , 160 μM y 4557 μM , respectivamente). Mientras que el tirosol no alcanzaba la capacidad de inhibir el 50% de la enzima. Por tanto, observamos con estos datos que dichos compuestos fenólicos procedentes del AOV ejercen un efecto inhibitor de la ECA. En un trabajo con *Ligustrum vulgare* L., de la misma familia que el olivo, detectan que el extracto de hojas es el más rico en compuestos activos, frente al extracto de flores y frutos. Aislan fundamentalmente secoiridoides, ligstrósido aglicona y oleuropeína aglicona, con valores de IC_{50} para la ECA de 20 μM y 25 μM , respectivamente (Kiss et al., 2008).

En cuanto al valor de IC_{50} adecuado para que un compuesto realmente muestre actividad antihipertensiva *in vivo* existe disparidad de opinión entre los autores. Unos defienden que los valores deben estar comprendidos entre 100 μM y 500 μM para poder ejercer efecto fisiológico. Por el contrario otros lo limitan a valores $\leq 100 \mu\text{M}$. En cualquier caso, debemos asumir que la potencia antihipertensiva *in vivo* dependerá de la eficacia *in vitro* para inhibir la ECA (Miguel et al., 2006b). Si nos situamos dentro de este rango, la luteolina y el 3,4-DHPEA-EDA claramente se encuentran en situación privilegiada (valores $< 100 \mu\text{M}$), mientras que ácido cumárico,

ácido ferúlico, pinosresinol y p-HPEA-EDA, aún teniendo valores $> 100 \mu\text{M}$ quizá también puedan tener efecto *in vivo* por encontrarse entre 100 y 500 μM . Los valores del ácido ferúlico, pinosresinol y p-HPEA-EDA se acercan a los detectados por Liu (Liu et al., 2003) en su trabajo con taninos procedentes de plantas medicinales chinas detectando también actividad IECA *in vivo*.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que los compuestos no se encuentran aislados; así, en el caso de *Musanga* (familia *Urticaceae*), el extracto de hojas presenta una inhibición del 100%, mientras que ninguna de las fracciones por separado (flavonoides y procianidinas) alcanza valores parecidos. Los autores sugieren un efecto sinérgico (Lacaille et al., 2001). Quizá suceda lo mismo con los compuestos fenólicos del aceite de oliva y el hecho de encontrarse los compuestos juntos suponga un mayor efecto que el detectado por nosotros al trabajar con los compuestos por separado.

Número de grupos hidroxilo

La actividad IECA por parte de este tipo de compuestos muestra, según parece sugerir la bibliografía, una tendencia a aumentar en función del número de grupos -OH unidos a un anillo aromático (Kang et al., 2003; Oh et al., 2004; Tsutsumi et al., 1998). Al estudiar la estructura química de nuestros compuestos, comprobamos que se cumple dicha tendencia. La luteolina, presenta 4 grupos -OH unidos a un anillo aromático, de los cuales, dos de ellos en posición *orto-dihidroxi*, lo que podría explicar al menos en parte su bajo valor de IC_{50} . En el

caso de la luteolina, además, el valor que detectamos, 52.3 μM , es muy inferior al citado por Loizzo, 290 μM (Loizzo et al., 2007). En ambos casos se ha utilizado la misma ECA de pulmón de conejo, no obstante, pueden contribuir a esta diferencia el utilizar diferente metodología y sustrato, que podría influir en la afinidad de la enzima por sustrato.

En el caso del 3,4-DHPEA-EDA se ve claramente su superioridad debido a la distribución *orto-dihidroxi* de los grupos -OH, alcanzando valores muy similares al de la luteolina. Por el contrario, el pinosinol, presentando el mismo número de grupos -OH que el 3,4-DHPEA-EDA pero con una distribución no *orto-dihidroxi*, presenta menor capacidad inhibitoria. Estos datos apoyan la importancia de la distribución *orto-dihidroxi* a la hora de ejercer un mayor efecto inhibitorio sobre la ECA.

El hidroxitirosol por el contrario, con tres grupos -OH, y dos de ellos en posición *orto-dihidroxi* tiene una capacidad de inhibición muy baja, IC_{50} 4557.9 μM ; por lo que probablemente se tendrían que tener en cuenta otros factores diferentes al número de grupos -OH y su distribución.

Por otra parte Tsutsumi *et al.* detectaron siete flavonoides con capacidad IECA ($\text{IC}_{50} < 125 \mu\text{M}$). Todos ellos compartían un oxígeno heterocíclico en el carbono C4 y un grupo -OH en posición 7 del anillo aromático A, características que también comparte la luteolina (Tsutsumi et al., 1998).

Peso molecular

En tres estudios con flavanoles y procianidinas de cacao, concluyen que dichos compuestos ejercen una inhibición competitiva de la ECA desplazando el sustrato del sitio activo de la enzima; de modo que, a mayor peso molecular las procianidinas son más efectivas inhibiendo la ECA (Actis-Goretta et al., 2006; Actis-Goretta et al., 2003; Ottaviani et al., 2006). Mirando los 8 compuestos estudiados, se ve claramente una tendencia a mejorar el valor de IC_{50} con el aumento de peso molecular. Si ordenamos en sentido ascendente por peso molecular, tendremos tirosol < hidroxitirosol < cumárico < ferúlico < *p*-DHPEA-EDA < pinoresinol; los valores de IC_{50} irán mejorando, el tirosol no alcanza la capacidad de inhibición de la ECA como para poder calcular su IC_{50} ; el hidroxitirosol, con peso molecular algo superior, presenta bajo poder inhibitorio (IC_{50} 4557.9 μ M) lo que no correspondería con el número de grupos -OH pero se podría explicar por su bajo peso molecular, que no le permita un buen acceso al centro activo de la enzima. A partir de los otros compuestos (ácido cumárico, ácido felúrico, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EDA) se puede observar un descenso del valor de IC_{50} a medida que aumenta su peso.

Por tanto este efecto del peso molecular sobre la actividad IECA, parece ser uno de los posibles factores a tener en cuenta.

Ahora bien, si analizamos más detenidamente el caso de la luteolina y el 3,4-DHPEA-EDA, sucede que no se ajusta a lo

expuesto anteriormente. Por un lado, el peso molecular de la luteolina se sitúa entre el ácido ferúlico y el *p*-DHPEA-EDA, y el del 3,4-DHPEA-EDA entre el *p*-DHPEA-EDA y el pinosresinol, por lo que su IC₅₀ debería estar entre dichos valores. Este hecho explicaría que el mayor efecto inhibitorio de la ECA se debería tanto al peso molecular como a la posición *orto-dihidroxi* de los grupos -OH.

La influencia del Zinc

Al ser la ECA una enzima crucial en la regulación del sistema renina-angiotensina y dependiente de Zn²⁺, se ha sugerido que algunos flavonoides presentan actividad *in vitro* vía generación de complejos quelantes de este metal en el centro activo de la ECA (Lacaille et al., 2001; Loizzo et al., 2007; Oh et al., 2004). Esta teoría se ve corroborada en un estudio con *Clerodendron trichotomum* (familia *Verbenaceae*), cuyas yemas han sido utilizadas desde antiguo en Asia, China, Korea y Japón como tratamiento para la hipertensión. En las yemas detectan cuatro fenilpropanoides con efecto IECA, de los cuales acetósido y acetósido isómero, que mostraban el efecto IECA más potente, presentan 4 grupos -OH cada uno, pudiendo ser responsables, al menos en parte, del efecto inhibitorio debido a la formación de complejos quelantes de Zn²⁺ en el centro activo de la ECA (Kang et al., 2003). Parece haber consenso entre los autores en que el efecto inhibidor de este tipo de compuestos, pueda ser debido a la formación de complejos quelantes de Zn²⁺ en el centro activo de la enzima. Así pues, para que un compuesto sea inhibidor de la ECA,

aunque no hay unos límites establecidos, es esencial que cumpla los requisitos previamente mencionados (peso molecular y distribución *orto-dihidroxi* de los grupos -OH), además de ser capaz de unirse al sitio activo de la enzima y de establecer una fuerte interacción con el átomo de Zn^{2+} .

Un ejemplo sería el grupo $-CH=CH-COOH$ que diferencia el ácido cumárico del tirosol, determinando así la actividad del primero frente a la incapacidad de inhibición de la ECA por parte del segundo (tirosol). Otros autores han demostrado la capacidad de quelación de Zn^{2+} de diferentes hidroxiflavonas (Tsutsumi et al., 1998). Sugieren que el sitio preferencial de unión del Zn^{2+} se realiza por medio del $C=O$ del carbono 4 y el grupo -OH del carbono 3 del anillo C, y secundariamente el -OH del carbono 3 del anillo B (ver **Figura 4**).

Por tanto, parece que los compuestos fenólicos del aceite de oliva estudiados, se ajustan a dichos requisitos, y los resultados que obtenemos se pueden explicar en base a ellos.

Presencia de compuestos fenólicos en plasma

Al ser la ECA una proteína de membrana, la interacción de flavanoles y procianidinas con la enzima podría estar relacionada con el número de grupos -OH, ya que éstos determinan su capacidad de adsorción a la membrana y a la interfase lípido-agua. Sería factible, por tanto, que un acúmulo de estos compuestos en la superficie de las células endoteliales vasculares favorezca la interacción con la enzima, actuando sobre la regulación de la presión arterial (Actis-Goretta et al., 2003). Por tanto, si tirosol, hidroxitirosol,

oleuropeína, ligstrósido y sus agliconas son absorbidos, podría dar lugar a un acúmulo a nivel de endotelio capilar que permitiría las condiciones para producir un efecto IECA *in vivo*. Se sabe que la concentración de polifenoles en plasma, raramente excede de 10 μM , de hecho, las máximas concentraciones se suelen alcanzar tras 1-2 horas de la ingesta, excepto para los compuestos que tienen que ser digeridos antes de la absorción (D'Archivio et al., 2007).

La luteolina se detecta a los 60 min de la ingesta de 40 ml de AOV (Girona et al., Submitted), no obstante la concentración a la que se detecta es algo baja (0.013 μM a los 60 min) para el IC_{50} que presenta. Quizá el consumo constante, teniendo en cuenta la vida media de estos compuestos en plasma, suponga un acúmulo de los mismos, como sucede con tirosol e hidroxitirosol, bien por el propio consumo, o como resultado de la degradación o metabolismo de otros compuestos fenólicos mas complejos (Miro-Casas et al., 2003b).

Se ha citado la presencia del 3,4-DHPEA-EDA en plasma, su diferencia estructural con el p-HPEA-EDA es la presencia de un -OH más, quedando en posición *orto-dihidroxi*. Este hecho parece ser el responsable de su mejor valor de IC_{50} . Tenemos por tanto, dos de los compuestos estudiados con capacidad IECA situados en plasma humano tras la ingesta de AOV, que podrían ejercer su efecto en la superficie de las células endoteliales vasculares, y con ello mediar en la regulación de la presión arterial.

En un futuro serían necesarios estudios que se centraran en la detección de estos compuestos en plasma, su concentración y posibles efectos sobre la presión arterial.

Los datos aquí presentados se refieren a estudios *in vitro*, y las circunstancias *in vivo* cambian. En plasma, los polifenoles circulan unidos a proteínas, siendo la albúmina la más frecuente, no obstante, la afinidad variará en función de su estructura química. Esta unión tendrá consecuencias a la hora de liberar dichos metabolitos en su destino (células, tejidos), habría que confirmar si la unión polifenol-albúmina supone una inhibición de su actividad o no, y es posible que la absorción de los metabolitos por las células sea proporcional a la cantidad de producto libre (Ishii et al., 2008).

Hay que resaltar el hecho de que los compuestos luteolina y 3,4-DHPEA-EDA, que detectamos con mayor capacidad antioxidante, son también los que presentan mejor valor de IC₅₀. En ambos casos la presencia de grupos -OH y en posición *orto-dihidroxi* tienen importancia.

En resumen, nuestros datos sugieren que:

- los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva tienen valores IECA similares a datos previamente publicados.
- los valores de IC_{50} concuerdan con la presencia de grupos -OH, de modo que la presencia de -OH en una distribución *orto-dihidroxi* confieren mayor efecto IECA.
- "Mayor peso molecular mayor Inhibición", el aumento de peso molecular se relaciona con una mayor inhibición.
- Como agentes quelantes de Zn^{2+} deben cumplir unos requisitos estructurales que coinciden con los parámetros de número grupos -OH y su distribución y el peso molecular.
- Además, coincide que dos de los compuestos con Mayor poder ANTIOXIDANTE, también tienen Mayor poder IECA.

A la vista de los resultados parece factible que un aceite enriquecido con compuestos fenólicos seleccionados por su capacidad protectora, antioxidante y antihipertensiva, pueda mejorar los efectos beneficiosos para la salud de un AOV en su forma natural.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos del AOV con mayor actividad antioxidante son, en orden decreciente: **luteolina**, **rutina**, **hidroxitirosol**, **oleuropeína** y **3,4-DHPEA-EDA**.
2. Los compuestos fenólicos del AOV, luteolina, rutina, 3,4-DHPEA-EDA, hidroxitirosol y oleuropeína, pueden actuar de forma sinérgica aumentando la resistencia de la LDL a la oxidación inducida por Cu^{2+} .
3. Los compuestos fenólicos del AOV, luteolina, 3,4-DHPEA-EDA, pinosresinol, *p*-HPEA-EDA, ácido ferúlico, ácido cumárico e hidroxitirosol, presentan *in vitro* actividad inhibidora de la ECA.
 - ❖ El ***p*-HPEA-EDA** y **pinosresinol** ejercieron un efecto inhibitorio con un $\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{M}$.
 - ❖ La **luteolina** y el **3,4-DHPEA-EDA** con valores de IC_{50} del orden de $50 \mu\text{M}$, muestran una capacidad inhibitoria superior al resto de compuestos.
4. La luteolina y 3,4-DHPEA-EDA presentaron Mayor poder ANTIOXIDANTE y Mayor capacidad IECA.



ANEXOS

Código internacional de nomenclatura de aminoácidos de tres letras o una sola.

Aminoácido	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cistenína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Abreviaturas utilizadas:

AOV:	Aceite de Oliva Virgen
D:	3,4-DHPEA-EDA
ECA:	Enzima Conversora de Angiotensina
H:	Hidroxitirosol
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
IC ₅₀ :	Concentración de compuesto necesaria para inhibir el 50% de la enzima
IECA:	Inhibidor de la Enzima Conversora de Angiotensina
L:	Luteolina
LDL:	Lipoproteína de baja densidad
MUFA:	Ácidos grasos mono insaturados
NO:	Óxido nítrico
O ₂ ⁻ :	Anión superóxido
-OH:	Grupo hidroxilo
-OH:	Grupo hidroxilo
ONOO [•] :	Peroxinitrito
PA:	Presión Arterial
PAL:	Fenilalanina Amonio Liasa
PBS:	Phosphate-Buffer Saline
PD:	Presión Arterial Diastólica
Pm:	Peso molecular
ppm:	Partes por millón
PS:	Presión Arterial Sistólica
PUFA:	Ácidos grasos poliinsaturados
R:	Rutina
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de Oxígeno
SD:	Desviación estandar
SEM:	Error estandar de la media
SHR:	Ratas hipertensas espontáneas

Aportaciones científicas:

Antioxidant effect of virgin olive oil phenolic compounds and its detection in human plasma

Josefa Girona¹, Arantza Soler², Cecilia González¹, Rosa M^a Valls¹, Mercedes Heras¹, M Paz Romero², María-Isabel Covas³, M José Motilva², Luis Masana¹, Rosa Solà¹

¹ Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosis (CIBERDEM), Hospital Universitari St. Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

² Departament of Food Technology, Universitat de Lleida, Spain

³ Grup de Recerca en Risc Cardiovascular i Nutrició, Unitat de Lípids i Epidemiologia Cardiovascular (URLEC-CARIN), (CIBEROBN), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM - Hospital del Mar), Barcelona, Spain.

Aportaciones científicas:

Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) by phenolic compounds from virgin olive oil.

Cecilia González¹, Mar Contreras², M Paz Romero³, M José Motilva³, Luis Masana¹, Rosa Solà¹, M Isidra Recio²

¹ Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosis (CIBERDEM), Hospital Universitari St. Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

²Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid

Phone: +34 912587582/+34915622900 ext. 386

Fax: +34 915644853

Mail: recio@ifi.csic.es

³Departament of Food Technology, Universitat de Lleida, Spain

II Congreso Internacional sobre aceite de oliva y salud. Córdoba-Jaen, 20-22 November 2008. (comunicación oral).

Premio a la mejor presentación.

Aceite de Oliva, componentes minoritarios

Detection of phenolic compounds with verified in vitro LDL antioxidant activity in post-prandial human plasma following a virgin olive oil oral load

Autores

Rosa M^a Valls¹, Alba Macià², Josefa Girona¹, Cecilia González¹, Mercedes Heras¹, M Paz Romero², María-Isabel Covas³, M José Motiva², Luis Masana¹, Rosa Solà¹.

Centro:

¹Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosis (CBERDEM), Hospital Universitari St. Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

²Department of Food Technology, University of Lleida, Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

³Grup de Recerca en Risc Cardiovascular i Nutrició, Unitat de Lípids i Epidemiologia Cardiovascular (URLEC-CARIN), (CIBEROBN), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM - Hospital del Mar), Barcelona, Spain

Resumen

In a previous study, we had identified phenolic compounds such as hydroxytyrosol, oleuropein, 3,4-DHPEA-EDA, luteolin and rutin in virgin olive oil (VOO) which, individually or in combination conferred high resistance to LDL oxidation induced by Cu²⁺. However, only some of these VOO phenolic compounds were found in postprandial human plasma.

The aim of the present study was to assess these five phenolic compounds in postprandial human plasma following the consumption of 40 mL of VOO by two healthy volunteers.

Phenolic compounds from postprandial human plasma were isolated and quantified using a clean-up solid-phase extraction procedure and high performance liquid chromatography-mass spectrometry with UPLC coupled to a TQDTM mass spectrometer.

The following were identified in postprandial plasma 60 to 240 minutes following VOO ingestion: free forms of hydroxytyrosol, 3,4-DHPEA-EDA, oleuropein aglycone and luteolin. Rutin was not detected, probably because of its very low concentration in VOO. The non-detection of oleuropein in human plasma could be a consequence of human digestion causing the loss of the glucose molecule that forms part of the aglycone structure.

These results confirm the postprandial bioavailability of these 4 phenols of VOO and, as such, their potential for in vivo antioxidant capability.

Poster presentado en el **XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arterioesclerosis**, Madrid junio 2008.



Hospital Universitari de Sant Joan Reus



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IDENTIFICATION OF NOVEL ANTIOXIDANT ACTIVITY OF VIRGIN OLIVE OIL PHENOLS ON LDL OXIDATION

C González^a, J Girona^a, A Soler^b, M Heras^a, MP Romero^b, MI Covas^a, MJ Motiva^b, L Mañana^a, R Solà^a
 a. Unitat de Recerca en Lipids i Arterioesclerosis (CIBERDEM), Hospital Universitari St. Joan de Reus, ESPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus
 b. Departament de Tecnologia d'Aliments, Universitat de Lleida, Lleida
 c. Unitat d'Epidemiologia en Lipids i Cardiovascular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMM-Hospital del Mar).

Introduction

Phenolic compounds of virgin olive oil (VOO) with strong antioxidant LDL properties could protect against cardiovascular diseases. Prior studies focused on the phenolic compounds hydroxytyrosol and oleuropein while other phenolic fractions were not considered.

Objective

To evaluate the effect of VOO phenolic acids, secoiridoids, flavonoids and lignans, and the combination of more antioxidant phenolic compounds detected on LDL resistance oxidation and to identify these phenolic compound in postprandial plasma.

Methods

The antioxidant effect of 19 phenolic compounds was measured by the lag phase (min) during formation of LDL conjugated oxides induced by Cu²⁺ (final concentration 8µM). Two healthy subjects ingested 40 ml of VOO to determine postprandial plasma phenolic profile.

Results

The highest LDL oxidation resistance was observed with flavonoids (luteolin and rutin) and secoiridoids (oleuropein, dialdehyde form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA) and hydroxytyrosol). All these phenols possess an aromatic ring with hydroxyl structures in the ortho (3,4-dihydroxy) position. Furthermore, the combination of these five phenols increased up to threefold the resistance of LDL oxidation compared with each individual antioxidant activity (p<0.05). These phenolic structures have been detected and quantified at 120 min in the postprandial plasma of subjects after the ingestion of 40 mL of VOO.

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

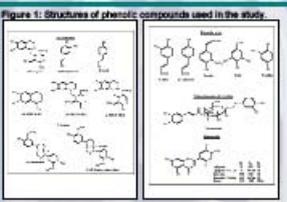


Figure 2: Conjugated oxides formation in LDL incubated with Cu²⁺ in the presence of increasing concentration of 3,4-DHPEA-EDA (0.1-10µM).

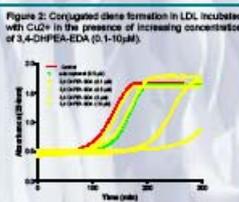


Figure 4: Prolongation of the lag phase of LDL after incubation with olive oil phenols (0.5 µM), luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropein, 3,4-DHPEA-EDA, gallic acid, acetoxylphenol, luteolin-7-O-glucoside, p-HPEA-EDA, caffeic acid, vanillin, 3,4-DHPEA-AC, p-coumaric acid, tyrosol, epigallocatechin gallate, ferulic acid, α-tocopherol in comparison to control LDL. Results are expressed as mean ± SEM, n=3. *p<0.05, Bonferroni test.

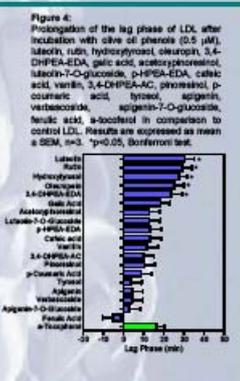


Figure 3: Concentration of the different phenols (luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropein, 3,4-DHPEA-EDA, gallic acid, acetoxylphenol, luteolin-7-O-glucoside, p-HPEA-EDA, caffeic acid, vanillin, 3,4-DHPEA-AC, p-coumaric acid, tyrosol, epigallocatechin gallate, ferulic acid) needed to initiate the lag phase.



Figure 5: Prolongation of the lag phase of LDL after incubation with olive oil phenols (0.2 µM): luteolin, rutin, hydroxytyrosol, oleuropein and 3,4-DHPEA-EDA and the cooperation effect of phenolic compounds in comparison to control LDL. H: Hydroxytyrosol; L: Luteolin; O: Oleuropein; R: Rutin and 3,4-DHPEA-EDA. Results are expressed as mean ± SEM, n=5. *p<0.05, Bonferroni test.

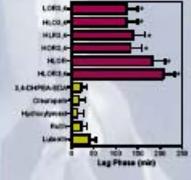


Figure 6: Phenol concentration (µM) in postprandial human plasma after the ingestion of 40 mL of VOO.

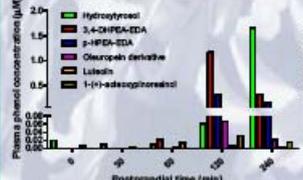
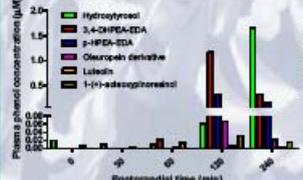


Figure 8: Phenol concentration (µM) in postprandial human plasma after the ingestion of 40 mL of VOO.



Conclusion

The antioxidant cooperation of the five phenolic compounds observed *in vitro*, and the detection for the first time of the secoiridoid aglycones 3,4-DHPEA-EDA and dialdehyde form of elenolic acid linked to tyrosol (p-HPEA-EDA), besides that hydroxytyrosol in postprandial human plasma could explain the *in vivo* LDL antioxidant protective role of the main components of the VOO phenolic fraction.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I. and Fraga, C.G., 2006. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem*, 54(1): 229-34.
- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I., Keen, C.L. and Fraga, C.G., 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett*, 555(3): 597-600.
- Aguilera, C.M. et al., 2004. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. *Clin Nutr*, 23(4): 673-81.
- Alarcon de la Lastra, C., Barranco, M.D., Motilva, V. and Herrerias, J.M., 2001. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des*, 7(10): 933-50.
- Alonso, A., Ruiz-Gutierrez, V. and Martinez-Gonzalez, M.A., 2006. Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutr*, 9(2): 251-7.
- Amiot, M.J., Fleuriet, A. and Macheix, J.J., 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J Agric Food Chem*, 34(5): 823-826.
- Ardiansyah, Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Koseki, T. and Komai, M., 2008. Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*, 56(8): 2825-30.
- Artajo, L.S., Romero, M.P., Morello, J.R. and Motilva, M.J., 2006. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *J Agric Food Chem*, 54(16): 6079-88.
- Aviram, M. and Dornfeld, L., 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting

- enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 158(1): 195-8.
- Bader, M. and Ganten, D., 2008. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*, 86(6): 615-21.
- Barz, W., Koester, J., Weltring, K.M. and Strack, D., 1985. Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals. *The Biochemistry of plant phenolics*. In: C.F. Van Sumere and P.J. Lea (Editors). Clarendon Press, Oxford, pp. 307-347.
- Basu, A. and Lucas, E.A., 2007. Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. *Nutr Rev*, 65(8 Pt 1): 361-75.
- Beecher, G.R., 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*, 133(10): 3248S-3254S.
- Bendini, A. et al., 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12(8): 1679-719.
- Birt, D.F., Hendrich, S. and Wang, W., 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 90(2-3): 157-77.
- Bloedon, L.T. et al., 2002. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 76(5): 1126-37.
- Bogani, P., Galli, C., Villa, M. and Visioli, F., 2007. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, 190(1): 181-6.
- Bonanome, A. et al., 2000. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 10(111-120).
- Bouaziz, M., Grayer, R.J., Simmonds, M.S., Damak, M. and Sayadi, S., 2005. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in Tunisia. *J Agric Food Chem*, 53(2): 236-41.

- Bourquelot, E. and Vintilesco, J., 1908. Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retire de l'olivier (*Olea europea* L.). *C R Acad Sci.*, 147: 533-535.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Braga, F.C. et al., 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. *Fitoterapia*, 78(5): 353-8.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J.J. and Garrido, A., 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J Agric Food Chem*, 47(9): 3535-40.
- Brenes, M., Garcia, A., Rios, J.J., Garcia, P. and garido, A., 2002. Use of 1-acetoxipinoresinol to autenticate Picual olive oils. . *Ins J Food Science Technol*, 37: 615-625
- Brenes, M., Hidalgo, F.J., García, A., Ríos, J.J., García, P., Zamora R., Garrido, A., 2000. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil . *J. Am.Oil Chem. Soc.*, 77: 715-720.
- Buiarelli, F., Di Berardino, S., Coccioli, F., Jasionowska, R. and Russo, M.V., 2004. Determination of phenolic acids in olive oil by capillary electrophoresis. *Ann Chim*, 94(9-10): 699-705.
- Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S. and Solla, F., 1999. A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J Agric Food Chem*, 47(4): 1745-8.
- Carollo, C., Presti, R.L. and Caimi, G., 2007. Wine, diet, and arterial hypertension. *Angiology*, 58(1): 92-6.
- Carrasco-Pancorbo, A. et al., 2006. Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *J Agric Food Chem*, 54(21): 7984-91.
- Carrasco Pancorbo, A., Cruces-Blanco, C., Segura Carretero, A. and Fernandez Gutierrez, A., 2004. Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *J Agric Food Chem*, 52(22): 6687-93.

- Caruso, D., Visioli, F., Patelli, R., Galli, C. and Galli, G., 2001. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism*, 50(12): 1426-8.
- Covas, M.I., 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol Res*, 55(3): 175-86.
- Covas, M.I. et al., 2006a. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med*, 40(4): 608-16.
- Covas, M.I. et al., 2006b. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 145(5): 333-41.
- Covas, M.I. et al., 2006c. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. *Nutr Rev*, 64(Supplement 1): 20-30.
- D'Archivio, M. et al., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43(4): 348-61.
- Davin, L.B., Bedgar, D.L., Katayama, T. and Lewis, N.G., 1992. On the stereoselective synthesis of (+)-pinosresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry*, 31(11): 3869-74.
- de Cavanagh, E.M. et al., 2003. Enalapril and losartan attenuate mitochondrial dysfunction in aged rats. *Faseb J*, 17(9): 1096-8.
- de Cavanagh, E.M., Piotrkowski, B. and Fraga, C.G., 2004. Concerted action of the renin-angiotensin system, mitochondria, and antioxidant defenses in aging. *Mol Aspects Med*, 25(1-2): 27-36.
- de la Puerta, R., Forder, R.A. and Hoult, J.R., 1999. Inhibition of leukocyte eicosanoid generation and radical scavenging activity by gnaphalin, a lipophilic flavonol isolated from *Helichrysum picardii*. *Planta Med*, 65(6): 507-11.
- de la Torre-Boronat, M.C., 1999. Scientific basis for the health benefits of the Mediterranean diet. *Drugs Exp Clin Res*, 25(2-3): 155-61.
- de la Torre-Carbot, K. et al., 2007. Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid

- chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 583(2): 402-10.
- Dell'Agli, M., Busciala, A. and Bosisio, E., 2004. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res*, 63(4): 593-602.
- Didelot, S. et al., 2006. Preparation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *International Dairy Journal*, 16: 976-983.
- Diebolt, M., Bucher, B. and Andriantsitohaina, R., 2001. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 38(2): 159-65.
- Dougherty, R.M., Galli, C., Ferro-Luzzi, A. and Iacono, J.M., 1987. Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. *Am J Clin Nutr*, 45(2): 443-55.
- Dulak, J. et al., 1999. Oxidized low density lipoprotein inhibits inducible nitric oxide synthase, GTP cyclohydrolase I and transforming growth factor beta gene expression in rat macrophages. *J Physiol Pharmacol*, 50(3): 429-41.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M., 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*, 6(1): 67-75.
- Ferrara, L.A. et al., 2000. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med*, 160(6): 837-42.
- Fito, M. et al., 2005. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181(1): 149-58.
- Fito, M., de la Torre, R. and Covas, M.I., 2007a. Olive oil and oxidative stress. *Mol Nutr Food Res*, 51(10): 1215-24.
- Fito, M. et al., 2007b. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*, 167(11): 1195-203.

- Fogelman, A.M., 2004. When good cholesterol goes bad. *Nat Med*, 10(9): 902-3.
- Fuchs, S. et al., 2008. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. *Hypertension*, 51(2): 267-74.
- Fujita, H., Usui, H., Kurahashi, K. and Yoshikawa, M., 1995. Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, 16(5): 785-90.
- Fuller, C.J. and Jialal, I., 1994. Effects of antioxidants and fatty acids on low-density-lipoprotein oxidation. *Am J Clin Nutr*, 60(6 Suppl): 1010S-1013S.
- Gilani, A.H., Khan, A.U., Shah, A.J., Connor, J. and Jabeen, Q., 2005. Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade. *Int J Food Sci Nutr*, 56(8): 613-20.
- Girona, J. et al., Submitted. Antioxidant effect of virgin olive oil phenolic compounds and their detection in human plasma
- Gomes, C.A. et al., 2003. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J Med Chem*, 46(25): 5395-401.
- Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G. and Ferri, C., 2005. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr*, 81(3): 611-4.
- Guzik, T.J., West, N.E., Pillai, R., Taggart, D.P. and Channon, K.M., 2002. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*, 39(6): 1088-94.
- Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A. and Schmitz, H.H., 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr*, 130(8S Suppl): 2086S-92S.
- Harborne, J., 1999. *Phytochemical Dictionary : A handbook of bioactive compounds from plants*
- Hata, Y. et al., 1996. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*, 64(5): 767-71.

- Hayes, J.D. and McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*, 31(4): 273-300.
- Hegsted, D.M., Ausman, L.M., Johnson, J.A. and Dallal, G.E., 1993. Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data. *Am J Clin Nutr*, 57(6): 875-83.
- Holt, R.R. et al., 2002. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*, 76(4): 798-804.
- Holvoet, P. et al., 2001. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(5): 844-8.
- Hooper, L. et al., 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 88(1): 38-50.
- Ichimura, T. et al., 2006. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70(3): 718-21.
- Ishii, T. et al., 2008. Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radic Biol Med*, 45(10): 1384-94.
- Jang, A. and Lee, M., 2005. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, 69: 653-661.
- Japon-Lujan, R., Ruiz-Jimenez, J. and de Castro, M.D., 2006. Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation zones by biophenol contents. *J Agric Food Chem*, 54(26): 9706-12.
- Kandaswami, C. et al., 2005. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 19(5): 895-909.
- Kang, D.G., Lee, Y.S., Kim, H.J., Lee, Y.M. and Lee, H.S., 2003. Angiotensin converting enzyme inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*. *J Ethnopharmacol*, 89(1): 151-4.
- Kiss, A.K., Mank, M. and Melzig, M.F., 2008. Dual inhibition of metallopeptidases ACE and NEP by extracts, and iridoids

- from *Ligustrum vulgare* L. *J Ethnopharmacol*, 120(2): 220-5.
- Kleinveld, H.A., Hak-Lemmers, H.L., Stalenhoef, A.F. and Demacker, P.N., 1992. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem*, 38(10): 2066-72.
- Kohyama, N., Nagata, T., Fujimoto, S. and Sekiya, K., 1997. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(2): 347-50.
- Kris-Etherton, P.M. et al., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*, 113 Suppl 9B: 71S-88S.
- Kuba, M., Tana, C., Tawata, S. and Yasuda, M., 2005. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochemistry*, 40: 2191-2196.
- Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S., Takeda, Y. and Yasuda, M., 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(6): 1278-83.
- Lacaille, D., Franck, U. and Wagner, H., 2001. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 8(1): 47-52.
- Lahera, V. et al., 2000. Sistema renina-angiotensina, Tratado de endocrinología básica y clínica. Ed. Síntesis, Madrid, pp. 1368-1384.
- Lamensdorf, I. et al., 2000. Metabolic stress in PC12 cells induces the formation of the endogenous dopaminergic neurotoxin, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde. *J Neurosci Res*, 60(4): 552 - 558.
- Lamuela-Raventos, R.M., Covas, M.I., Fito, M., Marrugat, J. and de La Torre-Boronat, M.C., 1999. Detection of dietary antioxidant phenolic compounds in human LDL. *Clin Chem*, 45(10): 1870-2.
- Leenen, R. et al., 2002. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. *J Agric Food Chem*, 50(5): 1290-7.

- Li, G.-H., Le, G.-W., Shi, Y.-H. and Shrestha, S., 2004. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from food and their physiological effects. *Nutrition Research*, 24: 469-486.
- Li, Y., Fang, H. and Xu, W., 2007. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. *Mini Rev Med Chem*, 7(7): 663-78.
- Liu, J.C. et al., 2003. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life Sci*, 73(12): 1543-55.
- Liu, M.L., Ylitalo, K., Salonen, R., Salonen, J.T. and Taskinen, M.R., 2004. Circulating oxidized low-density lipoprotein and its association with carotid intima-media thickness in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(8): 1492-7.
- Loizzo, M.R. et al., 2007. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother Res*, 21(1): 32-6.
- Maga, J.A., 1978. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 10(4): 323-72.
- Manna, C. et al., 1997. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr*, 127(2): 286-92.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Montedoro, G. and Zappia, V., 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem*, 10(3): 159-65.
- Marrugat, J. et al., 2004. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *Eur J Nutr*, 43(3): 140-7.
- Masaki, H., Okamoto, N., Sakaki, S. and Sakurai, H., 1997. Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell damage induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxides. *Biol Pharm Bull*, 20(4): 304-8.
- Masuda, O., Nakamura, Y. and Takano, T., 1996. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral

- administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*, 126(12): 3063-8.
- Mataix, J., 2004. *Aceite de oliva virgen y salud*. Universidad de Granada.
- Matoba, N., Usui, H., Fujita, H. and Yoshikawa, M., 1999. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett*, 452(3): 181-4.
- Matsufuji, H. et al., 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58(12): 2244-5.
- Mennen, L.I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C. and Scalbert, A., 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl): 326S-329S.
- Miguel, M., Aleixandre, M.A., Ramos, M. and Lopez-Fandino, R., 2006a. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE-inhibitory peptides derived from ovalbumin. *J Agric Food Chem*, 54(3): 726-31.
- Miguel, M., Lopez-Fandino, R., Ramos, M. and Aleixandre, A., 2005. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *Br J Nutr*, 94(5): 731-7.
- Miguel, M., Recio, I., Gomez-Ruiz, J.A., Ramos, M. and Lopez-Fandino, R., 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot*, 67(9): 1914-20.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M.A. and Aleixandre, M.A., 2006b. Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J Dairy Sci*, 89(9): 3352-9.
- Millán Nuñez, J., Rodríguez Artejo, F., 2005. *Medicina Cardiovascular: Arterioesclerosis*. Masson Barcelona.
- Miro-Casas, E. et al., 2003a. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem*, 49(6 Pt 1): 945-52.

- Miro-Casas, E. et al., 2003b. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr*, 57(1): 186-90.
- Miro-Casas, E. et al., 2001. Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem*, 294(1): 63-72.
- Mizuno, S. et al., 2005. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br J Nutr*, 94(1): 84-91.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M. and Miniati, E., 1992. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *J Agric Food Chem*, 40(9): 1577-1580.
- Morello, J.R., Vuorela, S., Romero, M.P., Motilva, M.J. and Heinonen, M., 2005. Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar. *J Agric Food Chem*, 53(6): 2002-8.
- Moschandreas, J., Vissers, M.N., Wiseman, S., van Putte, K.P. and Kafatos, A., 2002. Extra virgin olive oil phenols and markers of oxidation in Greek smokers: a randomized cross-over study. *Eur J Clin Nutr*, 56(10): 1024-9.
- Murkovic, M., Lechner, S., Pietzka, A., Bratacos, M. and Katzogiannos, E., 2004. Analysis of minor components in olive oil. *J Biochem Biophys Methods*, 61(1-2): 155-60.
- Nakamura, Y., Masuda, O. and Takano, T., 1996. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 60(3): 488-9.
- Nakamura, Y. et al., 1995a. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci*, 78(4): 777-83.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. and Takano, T., 1995b. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci*, 78(6): 1253-7.
- Navab, M. et al., 1996. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the

- 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(7): 831-42.
- Negishi, H. et al., 2004. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*, 134(1): 38-42.
- Oh, H. et al., 2004. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biol Pharm Bull*, 27(12): 2035-7.
- Oliveras-Lopez, M.J. et al., 2007. Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73(4): 726-32.
- Ottaviani, J.I., Actis-Goretta, L., Villordo, J.J. and Fraga, C.G., 2006. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie*, 88(3-4): 359-65.
- Owen, R.W. et al., 2000a. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*, 36(10): 1235-47.
- Owen, R.W. et al., 2000b. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol*, 38(8): 647-59.
- Paiva-Martins, F. et al., 2009. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol Nutr Food Res*, 53(5): 609-16.
- Panizzi, L.M., Scarpati, J.M. and Oriente, E.G., 1960. Costituzione dell'oléuropeina, glucoside amaro cd azione ipotensiva dell'ólivo. *Gazzetta Chimica Italiana*, 90: 1449-1485.
- Papamichael, C.M. et al., 2008. Acute combined effects of olive oil and wine on pressure wave reflections: another beneficial influence of the Mediterranean diet antioxidants? *J Hypertens*, 26(2): 223-9.
- Pérez-Jiménez, F., Alvatez de Cienfuegos, G., Badimón, L. and Barja, G., 2004. International Conference on the healthy effect of virgin olive oil Consensus report, Jaén (Spain). *Eur. J. Clin. Invest.*, 35: 421-424.

- Perona, J.S., Cabello-Moruno, R. and Ruiz-Gutierrez, V., 2006. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem*, 17(7): 429-45.
- Petroni, A. et al., 1995. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res*, 78(2): 151-60.
- Quiros, A., Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. and Recio, I., 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J Dairy Sci*, 88(10): 3480-7.
- Quiros, A. et al., 2006. Determination of the antihypertensive peptide LHLPLP in fermented milk by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Dairy Sci*, 89(12): 4527-35.
- Quiros, A. et al., 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 27: 33-41.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. and Zhang, L., 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23(4): 519-34.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20(7): 933-56.
- Rivas, M. et al., 2002. Soy milk lowers blood pressure in men and women with mild to moderate essential hypertension. *J Nutr*, 132(7): 1900-2.
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 51(10): 2866-87.
- Rodriguez-Rodriguez, R., Herrera, M.D., Perona, J.S. and Ruiz-Gutierrez, V., 2004. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta. *Br J Nutr*, 92(4): 635-42.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F.F. and Cimato, A., 1999. Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L. *J Agric Food Chem*, 47(3): 964-7.
- Romani, A. et al., 2000. HPLC analysis of flavonoids and secoiridoids in leaves of *Ligustrum vulgare* L. (Oleaceae). *J Agric Food Chem*, 48(9): 4091-6.

- Ruano, J. et al., 2005. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol*, 46(10): 1864-8.
- Ruiz-Gutierrez, V., Muriana, F.J., Guerrero, A., Cert, A.M. and Villar, J., 1996. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *J Hypertens*, 14(12): 1483-90.
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Ruperez, M. and Egido, J., 2001. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10(3): 321-9.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. and Lavee, S., 2002. Biotransformation of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci. Hortic.*, 92: 147-176.
- Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovich, M. and Robards, K., 2003. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J Agric Food Chem*, 51(9): 2532-8.
- Sarr, M. et al., 2006. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res*, 71(4): 794-802.
- Schiffrin, E.L., 2002. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med*, 113(5): 409-18.
- Schmidt-Ott, K.M., Kagiya, S. and Phillips, M.I., 2000. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept*, 93(1-3): 65-77.
- Sentandreu, M.A. and Toldra, F., 2006. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat Protoc*, 1(5): 2423-7.
- Sentandreu, M.A. and Toldrá, F., 2006. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem* 97: 546-554.
- Servili, M. et al., 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their

- occurrence in the oil. *J Chromatogr A*, 1054(1-2): 113-27.
- Shahidi, F. and Naczki, M., 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton [etc.] : CRC Press, cop. , 558 p pp.
- Sotiroudis, T.G. and Kyrtopoulos, S.A., 2008. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. *Eur J Nutr*, 47 Suppl 2: 69-72.
- Spencer, J.P., Abd El Mohsen, M.M., Minihaie, A.M. and Mathers, J.C., 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr*, 99(1): 12-22.
- Suarez, M., Macia, A., Romero, M.P. and Motilva, M.J., 2008. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *J Chromatogr A*, 1214(1-2): 90-9.
- Takano, T., 2002. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4): 333-40.
- Taubert, D., Berkels, R., Roesen, R. and Klaus, W., 2003. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *Jama*, 290(8): 1029-30.
- Togna, G.I., Togna, A.R., Franconi, M., Marra, C. and Guiso, M., 2003. Olive oil isochromans inhibit human platelet reactivity. *J Nutr*, 133(8): 2532-6.
- Trichopoulou, A., Bamia, C. and Trichopoulos, D., 2005. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Intern Med*, 165(8): 929-35.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C. and Trichopoulos, D., 2003. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*, 348(26): 2599-608.
- Tsutsumi, Y., Shimada, A., Miyano, A., Nishida, T. and Mitsunaga, T., 1998. In vitro screening of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *J. Wood Sci.*, 44 463-468.

- Tuck, K.L. and Hayball, P.J., 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem*, 13(11): 636-644.
- Uccella, N., 2001. Olive biophenols: biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9-10): 315-327.
- Ursini, F. et al., 1998. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 25(2): 250-2.
- Visioli, F., Bogani, P., Grande, S. and Galli, C., 2005a. Mediterranean food and health: building human evidence. *J Physiol Pharmacol*, 56 Suppl 1: 37-49.
- Visioli, F. et al., 2000a. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(3): 797-9.
- Visioli, F. et al., 2005b. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr*, 44(2): 121-7.
- Visioli, F. et al., 2001. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res*, 34(3): 301-5.
- Visioli, F. and Galli, C., 2002. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 42(3): 209-21.
- Visioli, F. et al., 2000b. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett*, 468(2-3): 159-60.
- Visioli, F. et al., 2000c. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation*, 102(18): 2169-71.
- Vissers, M.N., Zock, P.L., Wiseman, S.A., Meyboom, S. and Katan, M.B., 2001. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr*, 55(5): 334-41.
- Vlahov, G., Del Re, P. and Simone, N., 2003. Determination of geographical origin of olive oils using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. I - Classification of olive oils of the Puglia region with denomination of protected origin. *J Agric Food Chem*, 51(19): 5612-5.

- Waterman, E. and Lockwood, B., 2007. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*, 12(4): 331-42.
- Wei, L. et al., 1991. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. *J Biol Chem*, 266(9): 5540-6.
- Weinbrenner, T. et al., 2004a. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr*, 134(9): 2314-21.
- Weinbrenner, T. et al., 2004b. Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans. *Drugs Exp Clin Res*, 30(5-6): 207-12.
- Willett, W.C. et al., 1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*, 61(6 Suppl): 1402S-1406S.
- Williamson, G. and Manach, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl): 243S-255S.
- Wong, J., Patel, R.A. and Kowey, P.R., 2004. The clinical use of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Prog Cardiovasc Dis*, 47(2): 116-30.
- Wu, J. and Ding, X., 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*, 49(1): 501-6.
- Wu, J. and Muir, A.D., 2008. Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soybean Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *J Agric Food Chem*, 56(21): 9899-904.
- Yamamoto, N. and Takano, T., 1999. Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung*, 43(3): 159-64.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVO DE DIFERENTES COMPUESTOS FENÓLICOS
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN "IN VITRO"
Cecilia González Gómez-Navarro
ISBN:978-84-692-9051-4/DL: T-2058-2009



Que cada amanecer
siga siendo un canto a la vida,
y cada noche estrellada
una oda a la esperanza

Cambrils, Agosto 2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVO DE DIFERENTES COMPUESTOS FENÓLICOS
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN "IN VITRO"
Cecília González Gómez-Navarro
ISBN:978-84-692-9051-4/DL: T-2058-2009